

**UNIVERZITA KARLOVA**

**Přírodovědecká fakulta**

Katedra biochemie



**Denisa Zrubecká**

Příprava preptinu, peptidu sekretovaného beta buňkami, a jeho vliv na sekreci insulinu

Preparation of preptin, a peptide secreted from pancreatic islet beta cells, and its effect on insulin secretion

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Lenka Žáková, Ph.D.

Praha, 2019

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele a všechny použité prameny jsem řádně citovala. Současně prohlašuji, že tato práce ani její podstatná část nebyla použita k získání jiného akademického titulu.

V Praze dne 27. 5. 2019

## **Poděkování**

Úvodem bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Lence Žákové, Ph.D. za vstřícnost a obrovskou pomoc nejen při vypracování mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu skupiny RNDr. Jiřího Jiráčka, CSc. za veškerou pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí. V neposlední řadě musím poděkovat své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

## **Abstrakt**

Slinivka břišní vylučuje řadu látek podílejících se na regulaci fyziologických procesů v organismu. Po dlouhou dobu se vědělo, že beta buňky slinivky vylučují insulin. Spolu s ním vylučuje ale i další látky, mezi nimi mnoho peptidů, jako jsou insulinu podobné růstové faktory IGF, kratší peptidy jako amylin a jiné. Ve směsi těchto peptidů produkovaných slinivkou byl v roce 2001 skupinou Ch. Buchananové z Univerzity v Aucklandu identifikován peptid dlouhý 34 aminokyselin, které sekvencí přesně odpovídají části proformy insulinu podobného růstového faktoru 2 (pro-IGF-2). Tento peptid byl nazván preptin. Následně bylo zjištěno, že preptin má pozitivní vliv na proliferaci osteoblastů a že zesiluje sekreci insulinu z beta buněk v přítomnosti glukosy. V současnosti je aktivně studován zejména jeho vliv na proliferaci kostních buněk za účelem možného využití v léčbě osteoporózy.

Tato práce se soustředí na přípravu a charakterizaci lidského a potkaního preptinu a také jejich dvou fragmentů obsahujících aminokyseliny 1-16 a 17-34 syntézou peptidů na pevné fázi. Další část je zaměřena na testování vlivu potkaního preptinu a jeho fragmentů na sekreci insulinu v linii potkaních beta buněk INS-1E. Součástí práce jsou také vazebné testy lidského preptinu a jeho fragmentů na insulinový receptor a IGF-1 receptor provedené na základě kompetice mezi preptinem a radioaktivně značeným lidským insulinem, respektive radioaktivně značeným IGF-1 o vazbu na receptor.

**Klíčová slova:** preptin, insulin, IGF, IGF-1R, IR-A, pankreas

## **Abstract in English**

Pancreas is an endocrine tissue which affects many physiological processes in organism. It has been known for a long time that the pancreatic beta cells secrete insulin. However, there are more hormones and substances secreted from the beta cells, mainly peptides such as insulin-like growth factors IGF, shorter peptides like amylin and many more. Some of them have not been even identified. Among these pancreatic products Ch. Buchanan's group from Auckland University, New Zealand identified a 34 amino acid long peptide called prepropancreatin in 2001. Its amino acid sequence is identical with part of the preform of insulin-like growth factor 2 chain. It has been discovered that prepropancreatin has an effect on osteoblast proliferation and insulin secretion. Nowadays prepropancreatin is being studied like a potential osteoporosis cure thanks to its increasing effect on osteoblast proliferation.

This thesis describes preparation and characterization of human and rat prepropancreatin and their two fragments (which contain amino acids 1-16 and 17-34) using solid-phase synthesis. The aim of the thesis is to test effects of rat prepropancreatin and its two fragments on insulin secretion in pancreatic beta cell line INS-1E. Part of the thesis is focused on binding assays of human prepropancreatin and its two fragments to IGF-1 receptor and also to insulin receptor. These assays are based on the competition between prepropancreatin and radioactively marked human insulin or radioactively marked IGF-1 to the binding sites of the receptors.

**Keywords:** prepropancreatin, insulin, IGF, IGF-1R, IR-A, pancreas

(In Czech)

## Obsah

1	Úvod .....	1
1.1	Hormony .....	1
1.2	Slinivka břišní .....	2
1.2.1	Beta buňky .....	3
1.3	Preptin .....	4
1.4	IGF .....	6
1.4.1	IGF-1 .....	8
1.4.2	IGF-2 .....	9
1.4.3	Syntéza IGF-2 .....	9
1.4.4	Funkce IGF-2 v organismu .....	12
1.5	IGFBP .....	13
1.6	Receptory interagující s IGF proteiny .....	13
1.6.1	Insulinový receptor (IR-A, IR-B) .....	15
1.6.2	IGF-1 receptor .....	18
1.6.3	Hybridní receptory .....	18
1.6.4	IGF-2 receptor .....	18
2	Cíl práce .....	21
3	Materiál a metody .....	22
3.1	Použité chemikálie .....	22
3.2	Použité buněčné linie .....	23
3.3	Použité přístroje .....	23
3.4	Příprava preptinu .....	24
3.4.1	Automatická syntéza na pevné fázi .....	24
3.5	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) .....	24
3.5.1	Analytické provedení RP-HPLC .....	24
3.5.2	Preparativní RP-HPLC .....	25
3.6	Hmotnostní spektrometrie .....	25
3.7	Testování vlivu preptinu na sekreci insulinu .....	25
3.7.1	Příprava roztoků preptinu pro testování sekrece insulinu .....	25
3.7.2	Příprava buněk INS-1E pro testování sekrece insulinu .....	26
3.7.3	Sekrece insulinu .....	26

3.7.4	Radioimunologické stanovení (RIA) .....	27
3.8	Testování vazebné afinity preptinu k IR-A .....	28
3.8.1	Příprava buněk pro vazebné testy .....	28
3.8.2	Stanovení vazebné afinity preptinu k IR-A .....	29
3.9	Testování vazebné afinity preptinu k IGF-1R .....	29
3.9.1	Příprava buněk pro vazebné testy .....	29
3.9.2	Stanovení vazebné afinity preptinu k IGF-1R .....	30
3.10	Cirkulární dichroismus preptinu .....	30
4	Výsledky .....	31
4.1	Příprava preptinu .....	31
4.1.1	Automatická syntéza na pevné fázi .....	31
4.1.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) .....	31
4.1.3	Hmotnostní spektrometrie .....	34
4.2	Testování sekrece insulinu .....	38
4.2.1	Radioimunologické stanovení .....	38
4.3	Testování vazebné afinity preptinu k IR-A .....	39
4.4	Testování vazebné afinity preptinu k IGF-1R .....	39
4.5	Cirkulární dichroismus .....	40
5	Diskuse .....	41
6	Závěr .....	43
7	Seznam použité literatury .....	44

## Seznam zkratek

$\alpha$ -CT	C-koncový segment alfa podjednotky insulinového receptoru
Akt	proteinkinasa B (z <i>angl.</i> thymomas of AKR mice)
AMK	aminokyselina
bp	pár bází (z <i>angl.</i> base pair)
big-IGF-2	prodloužená forma IGF-2
CD	cirkulární dichroismus
cpm	počet impulzů za minutu (z <i>angl.</i> counts per minute)
CR doména	doména bohatá na cystein (z <i>angl.</i> cystein-rich)
DCM	dichlormethan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DODT	3,6-dioxo-1,8-oktandithiol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ERK	MAP kinasa, aktivuje transkripční faktory vedoucí k dělení buněk (z <i>angl.</i> extracellular signal-regulated kinase)
ESI	ionizace elektrosprejem (z <i>angl.</i> electrospray ionization)
FBS	fetální hovězí sérum (z <i>angl.</i> fetal bovine serum)
Fmoc-skupina	9-fluorenyl-methyloxykarbonylová skupina
FnIII	fibronektin typu III
GH	růstový hormon (z <i>angl.</i> growth hormone)
GLUT-4	glukosové transportéry typu 4
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinylethansulfonová kyselina
HBB pufr	HEPES binding pufr
KRBH pufr	Krebsův-Ringerův bikarbonatový HEPES pufr
<sup>125</sup> I	izotop jódu s nukleonovým číslem 125
IGF	insulinu podobný růstový faktor (z <i>angl.</i> insuline-like growth factor)
IGF-1, -2	insulinu podobný růstový faktor 1,-2
IGF-1R	receptor pro IGF-1
IGF-2R	receptor pro IGF-2
IGFBP	protein vázající IGF (z <i>angl.</i> IGF-binding protein)
IgG	imunoglobulin G
IU	mezinárodní jednotka (z <i>angl.</i> international unit)



IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
IR	insulinový receptor
IR-A, -B	insulinový receptor isoforma A, -B
IRS	signální protein na insulinovém receptoru (z <i>angl.</i> insulin receptor substrate)
MALDI	hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpceí a ionizací za účasti matrice (z <i>angl.</i> matrix-assisted laser desorption/ionization)
MAPK	kinasa signalizační kaskády vedoucí k dělení buňky (z <i>angl.</i> mitogen-activated protein kinases)
M6P	manosa-6-fosfát
PC4	proteasa proprotein konvertasa 4, štěpí pro-IGF-2
PCOS	syndrom polycystických ovarií (z <i>angl.</i> polycystic ovary syndrom)
PEG	polyethylenglykol
PI3K	fosfatidylinositol-3-kinasa
PKC	proteinkinasa C
PLC	fosfolipasa C
QC	kontrola kvality stanovení (z <i>angl.</i> quality control), purifikovaný potkaní insulin
RIA	radioimunologické stanovení (z <i>angl.</i> radioimmunoassay)
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází (z <i>angl.</i> reverse phase high-performance liquid chromatography)
RPMI pufr	pojmenován po Roswell Park Memorial Institutu
<i>tBu</i>	terc-butylová chránicí skupina
TFA	trifluoroctová kyselina
TFE	2,2,2-trifluorethanol
TIS	triisopropylsilan

Dále jsou užívány třípísmenné zkratky L- aminokyselin v souladu s doporučeními IUPAC.

# 1 Úvod

## 1.1 Hormony

V mnohobuněčných organismech je vzájemná komunikace mezi jednotlivými buňkami důležitá pro správnou regulaci činnosti organismu zajištěna chemickými signály. Podle vzdálenosti, na kterou dané chemické signály působí, rozlišujeme působení parakrinní (v rámci navzájem blízkých buněk), autokrinní (v rámci jedné buňky) nebo endokrinní (na větší vzdálenosti, kdy je chemická látka zprostředkovávající signál vyloučena do tělních tekutin, nejčastěji do krve, a v nich transportována k cílové buňce). Chemickými signály mohou být malé molekuly v podobě iontů, aminokyselin, peptidů, nebo složitější molekuly jako proteiny či steroidní látky. Látky vylučované do krve za účelem regulace vzdálené tkáně či orgánu prostřednictvím interakce s cílovými buňkami v dané tkáni se nazývají hormony. Mezi žlázy s vnitřní sekrecí, které vylučují do krve hormony a zajišťují regulaci dějů v organismu, patří hypofýza, štítná žláza, kůra nadledvin, dřeň nadledvin, gonády, epifýza, slinivka břišní a příštítná tělíska.

Na přelomu 60. a 70. let došlo k zásadnímu objevu, že působení hormonů probíhá přes receptory. Působení hormonů je specifické, interagují pouze s buňkami, které obsahují příslušný receptor schopný reverzibilně vázat daný hormon za vzniku hormon-receptorového komplexu, a tím iniciovat v buňce požadovanou odezvu. Po splnění svého úkolu se komplex rozpadá a receptor je vrácen do své původní konformace. Buňky, které daný receptor nemají, nejsou schopny hormon rozeznat, proto hormony působí pouze v určitých buňkách organismu. Buněčnými receptory jsou nejčastěji proteiny nebo glykoproteiny, které jsou schopné specificky rozeznat a s vysokou afinitou vázat daný ligand (hormon) a katalyzovat reakce vedoucí ke změnám biochemických a fyziologických pochodů v buňkách, a tak se podílet na regulaci celého organismu.

Mechanismus působení hormonu je dán jeho chemickou povahou. Podle chemické povahy rozlišujeme hormony steroidní, hormony odvozené od aminokyselin, peptidy a proteiny. Steroidní hormony díky své nepolární povaze pronikají přes cytoplazmatickou membránu do buněk, nepotřebují ke svému účinku membránový receptor, ale interagují až uvnitř buňky v cytoplazmě s intracelulárními receptory, které pak pronikají jadernou membránou a které jsou nejčastěji zodpovědné za interakci s jadernou DNA a regulují

tak transkripci a genovou expresi proteinů. O hormonech, které působí tímto mechanismem, říkáme, že mají tzv. genomové účinky. Naopak hormony polární povahy působí na cílové buňky přes příslušný receptor ukotvený v plazmatické membráně, vzájemná interakce hormonu s receptorem vyvolá v buňce požadovaný efekt nejčastěji pomocí sledu navazujících reakcí, tzv. signalizační kaskády. Protože dochází k aktivaci již existujících systémů v buňce a nedochází k ovlivnění genové exprese, jsou tyto účinky negenomové. Oproti genomovým účinkům vyvolává tento mechanismus působení požadovanou odezvu podstatně rychleji, proto se vyskytuje zejména v případech, kdy je po organismu vyžadována rychlá reakce – např. působení epinefrinu a norepinefrinu při leknutí. Z důvodu lepší regulace jsou hormony proteinové a peptidové povahy obvykle syntetizovány ve formě prohormonů a preprohormonů, tedy větších molekul, které na rozdíl od pravého hormonu nejsou účinné, nevyvolávají v organismu žádné reakce a ze kterých enzymatickým štěpením vzniká pravý hormon.

## 1.2 Slinivka břišní

Slinivka břišní neboli *pankreas* je orgán uložený podélně v dutině břišní těsně za žaludkem. U dospělých jedinců je dlouhý okolo 15 cm a váží přibližně 60 gramů [1]. Už před objevem insulínu v roce 1922 se vědělo, že slinivka ovlivňuje metabolismus sacharidů. Je důležitým orgánem metabolismu glukosy, protože k syntéze insulínu zodpovědného za transport glukosy z krevního řečiště do buněk, kde je zpracována, nedochází v žádné jiné tkáni. Z histologického hlediska je tvořena několika typy buněk různých funkcí. Přibližně 2 % slinivky břišní tvoří tzv. Langerhansovy ostrůvky, objevené Paulem Langerhansem v roce 1869. Langerhansovy ostrůvky jsou tvořeny alespoň čtyřmi typy buněk – alfa buňky (soustředěné na okrajích, tvoří glukagon), beta buňky (vyplňují střed ostrůvků, tvoří zejména insulin, amylin, preptin, betagranin, pankreostatin a další), gama buňky (tvoří růstový hormon) a F buňky (vzniká zde pankreatický peptid ovlivňující gastrointestinální trakt). Jsou hustě protkány sítí krevních kapilár, které umožňují průchod vznikajících hormonů do krevního řečiště.

Pankreas však neplní pouze funkci jako endokrinní regulátor organismu, většina objemu slinivky je tvořena exokrinními buňkami produkujícími tzv. pankreatickou šťávu, tedy směs amylasy, lipasy a trypsinu, která je odváděna do *duodena* (dvanáctníku) tenkého střeva, kde se podílí na chemickém trávení polysacharidů, tuků a proteinů.

### 1.2.1 Beta buňky

Beta buňky tvoří největší část, přibližně 60 % objemu, Langerhansových ostrůvků. Jsou vyplněny sekrečními granuly, ve kterých dochází k dozrávání insulínu. Insulin je syntetizován na ribozomech drsného endoplazmatického retikula beta buněk ve formě preproinsulínu. Po odštěpení signální sekvence, která napomáhá sbalení a vzniku terciální struktury, vzniká proinsulin. Ten je pomocí membránových váčků transportován do Golgiho aparátu, kde je uchováván v nezralých sekrečních granulích. Během dozrávání se vnitřní prostředí sekrečních granulí stává kyselým, což způsobuje aktivaci proteas a dochází k přeměně proinsulínu na insulin, který je uložen v již zralých sekrečních granulích. Sekrece insulínu probíhá exocytosou sekrečních granulí v důsledku zvýšení hladiny glukosy v krvi [2].

Proinsulin se od zralého insulínu liší přítomností C-peptidu, spojujícího řetězce A a B. Lidský proinsulin je dlouhý 86 aminokyselin, ale v rámci savců říše bychom kvůli rozdílné délce C-peptidu našli i délky mírně odlišné. Struktura insulínu, tvořená dvěma polypeptidovými řetězci, byla vyřešena v roce 1969 pomocí rentgenostrukturní analýzy [3]. Řetězec A obsahuje 21 aminokyselin a tvoří 2 alfa helixy spojené otáčkou. Řetězec B obsahuje 30 aminokyselin a tvoří třetí alfa helix obklopený z obou stran beta otáčkami a beta skládaným listem na C-konci. Prostorová struktura je udržována díky dvěma disulfidickým můstkům propojujícím řetězce A a B a jedním disulfidickým můstkem v rámci A řetězce.

Sekrece insulínu z beta buněk vyvolaná přítomností glukosy je známá po dlouhou dobu. Vylučování insulínu probíhá ve dvou fázích. Během primární fáze dochází díky fyziologickému podnětu (nemusí jím být pouze glukosa, ale i další živiny, případně neurotransmitery či hormony) k exocytose zralých sekrečních granulí obsahujících insulin z periferie beta buněk a tato fáze trvá pouze několik minut. Sekundární fáze sekrece obnáší navíc transport a následné uvolnění granulí z vnitřních vrstev beta buněk. K transportu je zapotřebí systému mikrotubulů uvnitř buněk. Sekundární fáze vylučování insulínu probíhá až do vyrovnání hladiny glukosy v krvi [4][5]. Mechanismus vazby insulínu na jeho receptor a celková regulace metabolismu glukosy je komplexní děj a jeho narušení může vést k různým onemocněním, jako je diabetes mellitus, některé druhy rakoviny nebo Alzheimerova choroba [6].

Po delší dobu se tušilo, že beta buňky netvoří pouze insulin, ale zřejmě i další hormony hrající v organismu nezanedbatelné role [7]. Byl objeven například amylin,

peptidový hormon vylučovaný společně s insulinem, a pokračovala snaha identifikovat i další proteiny obsažené v sekrečních granulích. V roce 2001 byl skupinou Ch. Buchananové z University v Aucklandu v sekrečních granulích izolovaných z kultury myších beta buněk  $\beta$ TC6-F7 identifikován 34 aminokyselin dlouhý peptid pojmenovaný preptin [1][8].

### 1.3 Preptin

Preptin je peptid sekretovaný beta buňkami Langerhansových ostrůvků pankreatu spolu s insulinem po stimulaci glukosou. Je dlouhý 34 aminokyselin a má molekulovou hmotnost okolo 4000 Da. Svou aminokyselinovou sekvencí (viz Obr. 1) odpovídá Asp<sup>69</sup> – Leu<sup>102</sup> E-peptidu pro-IGF-2 [2].

	1	5	10	15	20	25	30
Mouse	DVST	SQAVLP	DDFPRYP	VGLFF	QYDT	WRQS	AGRL
Rat	DVST	SQAVLP	DDFPRYP	VGKFF	KFD	WRQS	AGRL
Human	DVST	PPTVL	PDNFP	PRYP	VGKFF	QYDT	WKQSTQRL

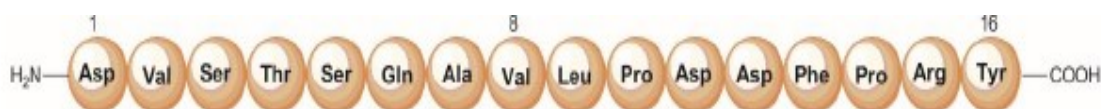
**Obr. 1:** Obrázek znázorňující sekvenci aminokyselin myšího, potkaního a lidského preptinu s šedě vyznačenými shodnými pozicemi aminokyselin u všech tří druhů a bíle vyznačenými rozdíly.

U preptinu byla zjištěna schopnost zesilovat sekreci insulinu stimulovanou přítomností glukosy, konkrétně sekundární fázi sekrece, ale nikoliv ji vyvolávat. U hladovějících organismů, kdy není vylučován insulin, preptin sekreci neovlivnil. Zablokováním preptinu pomocí protilátek došlo ke snížení sekrece insulinu. Dosud není známo, jakým mechanismem preptin působí, předpokládá se, že přes receptor asociovaný s G-proteinem, jehož identita zůstává zatím neznámá [2][9].

Mimo zvyšování glukosou stimulované sekrece insulinu byl zkoumán vliv preptinu na proliferaci potkaních primárních embryonálních osteoblastů. Osteoblasty jsou buňky vytvářející kostní hmotu tím, že syntetizují kolagenová vlákna a regulují jejich mineralizaci. Následně se přeměňují na osteocyty, nebo zanikají apoptosou. Tyto experimenty ukázaly, že preptin má anabolický vliv na aktivitu osteoblastů *in vivo* a *in vitro*, stimuluje jejich proliferaci a diferenciaci, naopak redukuje apoptosu. Preptin neovlivňuje aktivitu osteoklastů (buněk odbourávající kostní tkáň) [10]. Pro správnou

stavbu kostí a skeletu je důležitá koordinace mezi tvorbou a resorpcí kostní hmoty. Bylo zjištěno, že právě tzv. nutriční hormony (hormony pankreatu) mají vliv na kostní tkáň. Příkladem může být nízký výskyt osteoporózy a nízká náchylnost k frakturám u obézních lidí v důsledku vyšší hladiny insulinu a dalších pankreatických hormonů vylučovaných spolu s insulinem [11][12]. U pacientů trpících chronickou hepatitidou C, kteří mají větší množství kostní hmoty, byla zjištěna zvýšená koncentrace preptinu. U pacientů s osteoporózou byla naopak jeho hladina nižší než u zdravých jedinců. Předpokládá se proto, že preptin a další pankreatické hormony jako amylin, insulin, které mají stejně jako preptin anabolický vliv na proliferaci osteoblastů, jsou spolu s lokálními růstovými faktory důležitými faktory v utváření kostry [10][7].

V současnosti je preptin velmi atraktivní pro laboratoře zabývající se vývojem léčiv osteoporózy. Osteoporóza je onemocnění projevující se úbytkem kostní hmoty a zeslabením kosterního aparátu. Je způsobena nerovnováhou mezi vytvářením kostní hmoty (aktivita osteoblastů) a její resorpcí (funkce osteoklastů). Přestože dnes existují léky schopné redukovat resorpci kostí, neumí však donutit osteoblasty k tomu, aby na místo ztracené kostní hmoty tvořily novou. Protože byl u preptinu zjištěn anabolický vliv na proliferaci osteoblastů a tvorbu kostní hmoty, jeví se terapeuticky jako velmi atraktivním. V současnosti existuje jediné léčivo s takovýmto efektem obsahující rekombinantní lidský parathyroidní hormon, je však velmi drahé a podle dosavadních studií zvyšuje riziko vzniku osteosarkomu. Bylo zjištěno, že za vliv na utváření kostní hmoty je zodpovědná N-terminální část preptinu odpovídající aminokyselinám 1-16 (viz Obr. 2). Z důvodu peptidové povahy je tento fragment sám o sobě nestabilní, proto je snaha o vývoj stabilnějších a minimálně stejně účinných analogů. Ukázalo se, že při zakomponování nekódované aminokyseliny dojde ke zvýšení stability. Při záměně serinu v pozici 3 za alanin došlo ke zvýšení mineralizace kostní hmoty. Po modifikaci na cyklické molekuly prostřednictvím propojení aminokyselin v řetězci vykazovaly analogy škodlivé účinky [13].



**Obr 2:** Aminokyselinová sekvence fragmentu preptinu 1-16. Převzato z [14].

Mechanismus působení preptinu není dosud znám, ale předpokládá se, že na osteoblasty působí přes receptor asociovaný s G proteinem, který vyvolá fosforylaci p42/44 MAP kinasy (z *angl.* mitogen-activated protein kinase), která reguluje transkripci a zvyšuje proliferaci osteoblastů [10]. Fragment preptinu 1-16 zřejmě nemá, na rozdíl od celého preptinu, žádný vliv na metabolismus glukosy, což ještě zvyšuje jeho atraktivitu v této oblasti [13].

Preptin zvyšuje koncentraci vápenatých iontů, pomocí kterých ovlivňuje sekreci insulinu. Mimo to zvyšuje expresi IGF-2 receptoru, který se podílí na degradaci IGF-2 v organismu a při nižší expresi tohoto receptoru vznikají nádorová onemocnění (viz kapitola 1.6.4). Je také zkoumána možná spojitost mezi preptinem a insulinovou resistencí. Zatím bylo zjištěno, že u pacientek s těhotenským diabetem korelovala vyšší hladina preptinu s resistencí vůči insulinu [15]. Dále proběhlo několik studií založených na hypotéze zodpovědnosti preptinu za vznik syndromu polycystických ovarií (PCOS, z *angl.* polycystic ovary syndrome). Původ tohoto onemocnění není dosud znám, často je spojeno právě s insulinovou rezistencí, s obezitou a diabetem mellitem druhého typu. Při všech těchto potížích je koncentrace preptinu v séru zvýšená, nebyla však zjištěna žádná přímá souvislost mezi hladinou preptinu a PCOS [16].

Kromě beta buněk pankreatu byl pomocí imunologických stanovení preptin nalezen také v lumen žaludku a v duodenu potkanů. Žaludek hraje významnou roli v řízení metabolismu, vylučuje hormony grelin a obestatin, které ovlivňují navozování pocitů sytosti či hladu a také se podílejí na metabolismu glukosy a tuků. Možná se na této regulaci podílí i preptin, ale jeho role v žaludku zatím není známa [9].

Protože se lidský, myší a potkaní preptin liší svou sekvencí (viz Obr. 1, str. 4), není preptin jednoho druhu schopný reagovat s receptory jiného druhu. Proto je při experimentech nutné používat modelové organismy stejného druhu [2].

## 1.4 IGF

Kromě spousty dalších růstových faktorů existují dva insulinu podobné růstové faktory, IGF-1 a IGF-2 (z *angl.* insulin-like growth factors). Jsou tvořeny zejména v játrech, ale vznikají a následně parakrinně či autokrinně působí ve většině tkání a orgánů. Původně byly nazývány somatomediny [17]. Exprese IGF-1 je kontrolována růstovým hormonem (GH), naopak sekrece IGF-2 je na růstovém hormonu nezávislá a pacienti se zvýšenou hladinou IGF-2 mají sníženou hladinu GH and IGF-1. Jsou to evolučně konzervované

jednořetězcové polypeptidy velké asi 7,5 kDa, z 50 % sekvenčně homologní s insulinem, se kterým mají i podobnou prostorovou strukturou (viz Obr. 3, str. 8) [18].

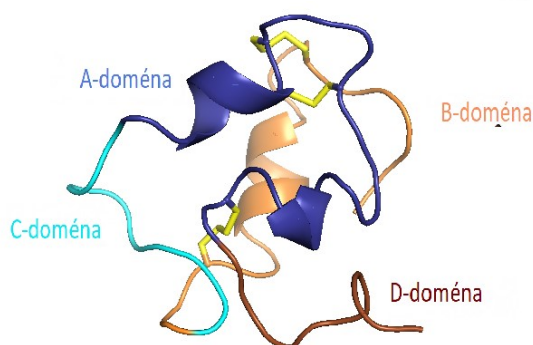
Zatímco insulin je uložen v beta buňkách a uvolňuje se ve velmi malých objemech, růstové faktory IGF nejsou nikde skladovány, ale cirkulují v krevní plazmě v koncentracích okolo 20 nM u IGF-1 a okolo 80 nM u IGF-2 a v nižších koncentracích ve většině tělních tkání. V krevní plazmě nejsou volné, ale jsou vázány v komplexu s vazebnými proteiny pro IGF, IGFBP (z *angl.* IGF-binding proteins). Dosud bylo objeveno 6 IGFBP označovaných IGFBP1-6. Více jak 90 % IGF je vázáno na IGFBP3.

Oba IGF jsou důležité během embryonálního vývoje, po narození se zdá být více dominantní IGF-1, který reguluje růst. Jeho množství v organismu s věkem klesá. Hladiny IGF-2 jsou také nejvyšší po narození, ale s věkem neklesají tolik a v dospělém organismu je třikrát vyšší koncentrace IGF-2 oproti koncentraci IGF-1. Předpokládá se proto, že každý zastává jinou funkci. Při fyziologické koncentraci (IGF-1 přibližně 20 nM a IGF-2 asi 60 nM) stimulují proliferaci, případně diferenciaci buněk a při vysokých koncentracích vykazují metabolické účinky podobné insulinu [19]. Výchyly od průměrné koncentrace obou IGF v séru jsou spojovány s patologickými stavy spojenými s nekontrolovanou proliferací buněk, zejména s výskytem tumorů mezenchymálního a epiteliálního původu. Vysoká koncentrace IGF-2 v séru byla indikována u pacientů s diagnózou kolorektální rakoviny [18][20].

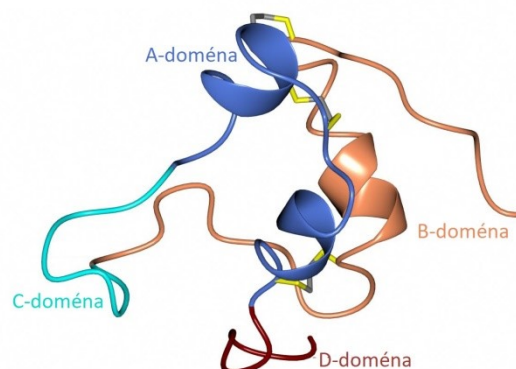
Studium struktury IGF není snadné, protože v roztoku snadno tvoří agregáty, ale pomocí NMR se podařilo určit terciární strukturu obou IGF. Ta je velmi podobná struktuře insulinového prekurzoru proinsulinu. IGF jsou tvořeny 4 doménami, postupně od N-konce jsou to domény B, C, A a D. Domény A a B jsou strukturně homologní s A a B řetězci insulinu a tvoří tři alfa helixy, jeden v doméně B a zbylé dva v doméně A. Stabilita terciární struktury je zajištěna třemi disulfidickými můstky (viz Obr. 3, str. 8) [21]. Na rozdíl od insulinu, který tvoří dimery a v sekrečních granulích koordinuje se zinečnatými ionty za tvorby hexamerů stabilizovanými interakcemi kyselin glutamových v pozici B13, oba IGF se vyskytují jako monomerní molekuly [22].



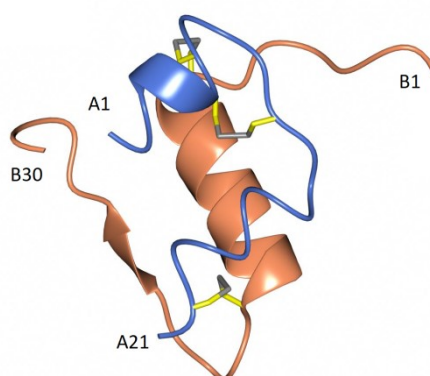
IGF-1



IGF-2



Insulin



**Obr. 3:** Znázornění terciální struktury IGF-1 (vlevo nahoře), IGF-2 (vpravo nahoře) a monomeru insulinu (vlevo dole). U obou IGF jsou barevně odlišené domény A, B, C, D a žlutě jsou vyznačeny disulfidické můstky. Ve struktuře insulinu jsou barevně odlišené řetězce A a B a žlutě vyznačené disulfidické můstky. Vytvořeno v PyMol 2.3 dle kódů z PDB: 1B9G, 1IGL a 2A3G a upraveno.

#### 1.4.1 IGF-1

IGF-1 je tvořen 70 aminokyselinami a má molekulovou hmotnost 7,65 kDa. Sekvence IGF-1 a IGF-2 je z 62 % homologní a oba jsou svou prostorovou strukturou podobné insulinu [23]. IGF-1 ovlivňuje proliferaci a diferenciaci buněk a také reguluje metabolismus glukosy aktivací signální kaskády RAS/RAF/MEK a PI3K/Akt. Exprese genu pro IGF-1 je ovlivňována růstovým hormonem, insulinem a dalšími hormony. Tvoří se zejména v játrech, odkud se dostává do krevního oběhu. V menší míře je produkován i dalšími orgány, kde působení parakrinně či autokrinně. Jeho hladina je nejvyšší v postnatálním období, kdy se jeho koncentrace zvýší přibližně na dvojnásobek koncentrace prenatální. Od adolescentního období pak jeho množství v organismu klesá. Nižší koncentrace IGF-1 je spojena s diabetem, protože se spolu s insulinem podílí na snižování

glykemie. V léčbě diabetu zatím není využitelný, protože klinické pokusy prováděné za tímto účelem byly spojeny s velkým množstvím nežádoucích účinků [24].

#### **1.4.2 IGF-2**

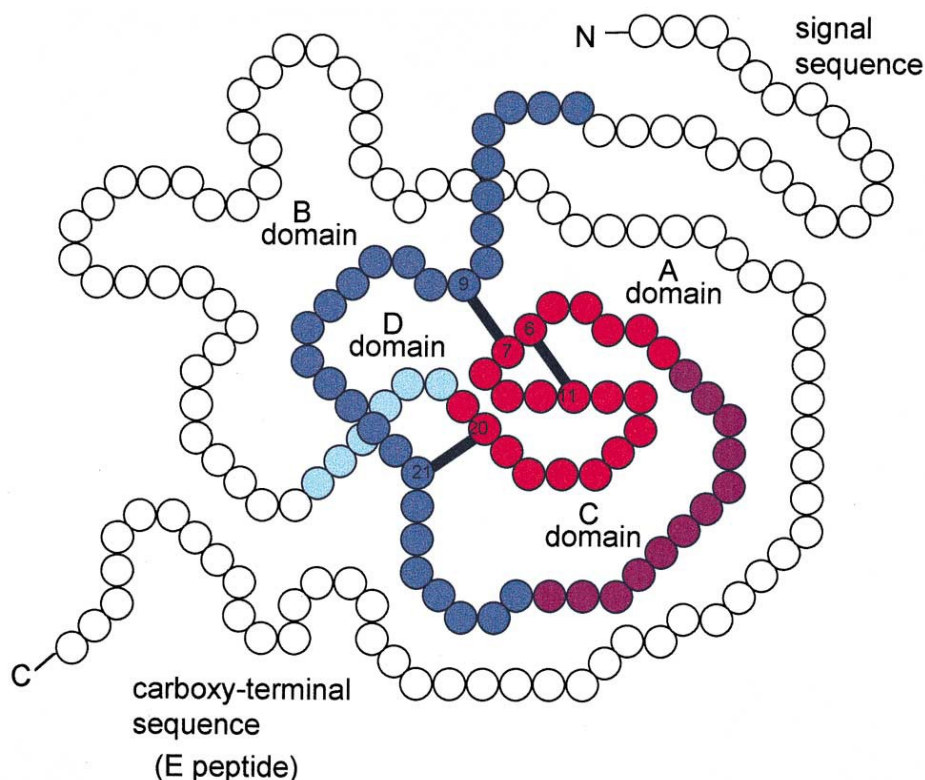
IGF-2 hraje u savců důležitou roli ve vývoji a růstu, zejména v průběhu prenatálního období, kdy ovlivňuje buněčné dělení, apoptosu a diferenciaci buněk. Je to peptid složený z 67 aminokyselin s molekulovou hmotností 7,47 kDa a z velké části je svou sekvencí homologní s insulinem a IGF-1 [17]. Gen pro IGF-2 je lokalizován na chromozomu 11 v regionu p15 přibližně ve vzdálenosti 1,6 kbp za genem pro insulin. Jeho velikost je přibližně 30 kbp a obsahuje 9 exonů a 4 promotory [25]. Díky posttranslačním modifikacím dává tento gen vzniknout nejméně třem různým peptidům [9]. Polymorfismus v genu pro IGF-2 ovlivňuje insulinovou sensitivitu jedince a má vliv také na vznik obezity [24]. U lidí a myši gen pro IGF-2 podléhá epigenetické regulaci, kdy je mateřská alela umlčena (tzv. imprinting), což znamená, že pro jeho funkci, a tedy správný embryonální vývoj, je nutná aktivní alela tohoto genu od otce. Chyby v umlčení mateřské alely zvyšují riziko některých druhů rakoviny a také výskyt Beckwith-Wiedemannova syndromu, který je spojen s nadměrnou produkcí IGF-2 a důsledkem je dosažení větší velikosti novorozenců [25].

#### **1.4.3 Syntéza IGF-2**

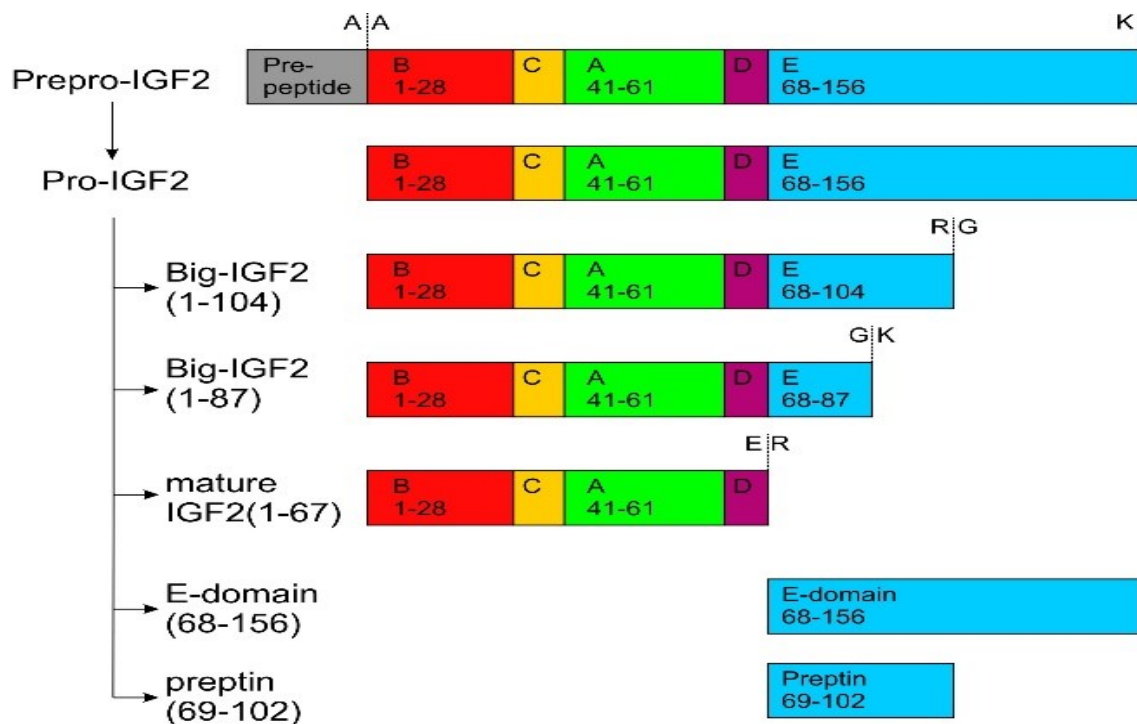
IGF-2 vzniká ve formě preprohormonu, který je schematicky znázorněn na Obr. 4 na str. 10. Obsahuje 24 aminokyselin dlouhou signální sekvenci, 67 aminokyselin, které odpovídají budoucímu zralému IGF-2 (1-67) a 89 aminokyselin na C-konci nazývaných doména E nebo také E-peptid (68-156). Po odštěpení signální sekvence vzniká 156 aminokyselin dlouhý pro-IGF-2, který je z části dále štěpen na zralý IGF-2, ale může zůstat i v této formě. Zralý IGF-2 je tvořen od N-konce doménami B, C, A a D. Domény A a B jsou strukturou shodné s insulinovými řetězci a jsou spojeny dvěma disulfidickými můstky A7-B9 a A20-B21. Doména A obsahuje navíc jednu vnitřní disulfidickou vazbu mezi A6-A11. Doména C spojuje C-konec domény B s N-koncem domény A a na rozdíl od C-peptidu insulinu není odštěpována v průběhu dozrávání. Od insulinu se také oba IGF odlišují přítomností domény D, která je připojena k C-konci domény A. Doména E je během dozrávání postupně štěpena (viz Obr. 5, str. 11). Pro-IGF-2 je lokalizován spolu s insulinem v beta buňkách [25][26].

Peptid, ve kterém je odštěpena pouze část domény E, se nazývá big-IGF-2. Může vznikat ve dvou formách podle místa štěpení – buď 1-87, nebo 1-104. Tyto prodloužené formy IGF-2 tvoří normálně asi 15 % veškerého IGF-2 v organismu. Tento poměr je však narušen při různých onemocněních, kdy může být až 60-80 % veškerého IGF-2 tvořeno prodlouženými formami [26]. Big-IGF-2 má kvůli odlišné struktuře jinou afinitu k IGFBP než zralý IGF-2, váže se na ně hůře, a proto ho nacházíme volně v plazmě, což je spojeno s některými karcinomy nebo osteoporózou (viz Obr. 8, str. 11). Je pravděpodobné, že big-IGF-2 se také hůře váže na IGF-2 receptor (IGF-2R), jehož funkcí je mimo jiné degradace IGF-2, a tedy snižování množství volného IGF-2 v krvi [26].

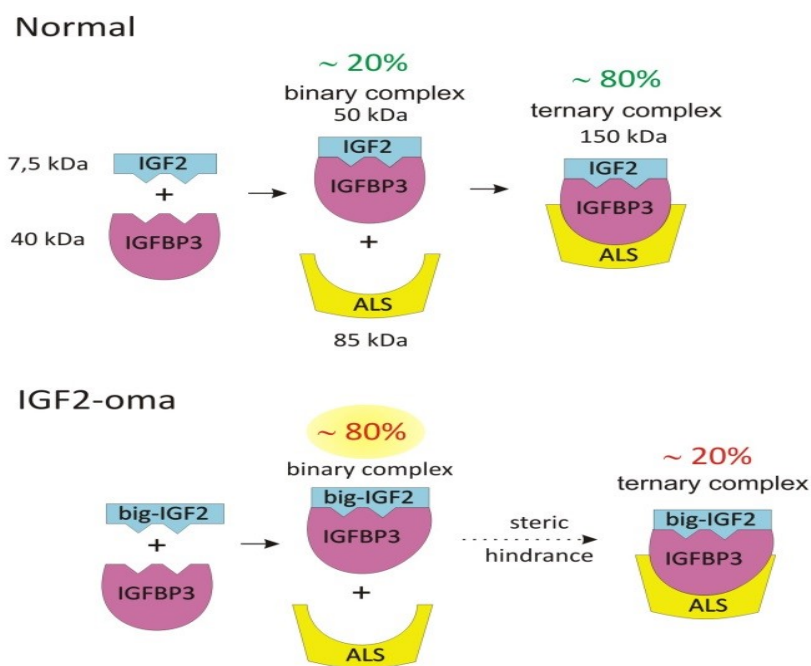
Při interakci s IGF receptory se uplatňují domény A a B. IGF-1-receptor (IGF-1R) a také insulinový receptor (IR) váží Phe<sup>26</sup> a Tyr<sup>27</sup> domény B. IGF-2R rozpoznává několik částí domény A. IGFBP interagují s B doménou [25][2].



**Obr. 4:** Znázornění struktury prepro-IGF-2. Prepro-IGF-2 obsahuje 24 aminokyselin dlouhou signální sekvenci na N-konci řetězce, 67 aminokyselin domén D, A, C a B tvoří základ budoucího zralého IGF-2 a na C-konci je 89 aminokyselin tvořících E-doménu. Doména E a signální sekvence jsou znázorněny bíle, doména D světle modře, doména A červeně, doména C fialově a doména B tmavě modře. Černě jsou vyznačeny disulfidické můstky (A7-B9, A20-B21 a A6-A11). Převzato a upraveno dle [25].



**Obr. 5:** Schéma postupného štěpení prepro-IGF-2 a vznik zralého IGF-2 odštěpením domény E. Preptin odpovídá aminokyselinám 69-102 domény E.



**Obr. 6:** Schéma znázorňující interakci IGF-2 a big-IGF-2 s IGFBP cirkulujícími v krevním oběhu. V horní části obrázku vidíme fyziologický stav, kdy je v organismu přítomen zralý IGF-2 tvořící ternární komplex s IGFBP a ALS (z *angl.* acid labile subunit). Ve spodní části je patologický stav nazývaný IGF-2-oma, kdy ternární komplex nevzniká kvůli nižší afinitě big-IGF-2 k IGFBP.

Přesný mechanismus štěpení pro-IGF-2 je zatím prozkoumán jen velice málo. Předpokládá se, že za štěpení za Arg<sup>68</sup> je zodpovědný proteolytický enzym PC4 (z *angl.* proprotein convertase) zmiňovaný v následující kapitole 1.4.4. Za Arg<sup>104</sup> pravděpodobně štěpí enzym furin [9].

#### 1.4.4 Funkce IGF-2 v organismu

IGF-2 redukuje koncentraci insulinu a glukagonu v krevní plazmě, podporuje oxidaci tuků, zvyšuje sensitivitu na insulin, hraje roli v metabolismu proteinů. U obézních jedinců a lidí s diabetem mellitem druhého typu byla zjištěna vyšší hladina IGF-2 než u zdravých jedinců. Zvýšená koncentrace IGF-2 zvyšuje riziko rozvoje rakoviny a kardiovaskulárních chorob [24].

IGF-2 reguluje růst. Knock-out genu pro IGF-2 u myši způsobil narození velmi malého novorozence, který byl normálně funkční a dožil se dospělého věku, ačkoliv zůstal trpasličí velikosti. Naopak při vyřazení funkce IGF-1 zemřela část novorozenců již krátce po porodu a ta část, která se dožila dospělosti, byla neplodná a disponovala menším množstvím svalstva a hůře osifikovanými kostmi [17].

IGF-2 je také spojen se správným vývojem placenty a plodu. Bylo prokázáno, že v těhotenství je hladina zralého IGF-2 zvýšená, naopak hladina pro-IGF-2 je nižší. Zvýšená je také hladina proteolytického enzymu PC4 (z *angl.* proprotein convertase 4), který je tvořen v placentě a je důležitý pro dozrávání IGF-2, protože štěpí pro-IGF-2. PC4 enzym patří do rodiny serinových proteas. Štěpí na C-konci za bazickými aminokyselinami a vzniká pravděpodobně pouze v reprodukčních orgánech. Vzhledem ke své sekvenci může být pro-IGF-2 štěpen celkem na třech místech a to za Arg<sup>104</sup>, Arg<sup>68</sup> a Lys<sup>88</sup>. Funkční IGF-2 vzniká při štěpení za Arg<sup>68</sup>. V sérii experimentů inhibice PC4 způsobila změnu štěpení pro-IGF-2, snížení plasmatické koncentrace zralého IGF-2 a naopak zvýšení koncentrace pro-IGF-2 a big-IGF-2. Zralý IGF-2 aktivuje fosfatidylinositol-3-fosfát dráhu přes IGF-1R a tím ovlivňuje nejen proliferaci buněk ale i jejich migraci, což je klíčové pro správný vývoj plodu. Pro-IGF-2 není této aktivace schopen. Chyby ve funkci PC4 enzymu jsou spojeny s nesprávným vývojem plodu, sérum postižených plodů obsahuje vyšší hladinu nezralého pro-IGF-2. Také matky, kterým se narodily postižené děti, měly odchylky v hladině zralého IGF-2. Potenciálně by v budoucnu mohla být tato znalost využita pro sledování správného průběhu těhotenství [27].

Nadměrná exprese IGF-2 může vést ke stavu nazývanému IGF-2-oma syndrom. Vyznačuje se výskytem nádorových onemocnění epiteliálního nebo mezenchymálního původu. Tumory samotné produkují IGF-2, což má kromě dalšího růstu tumoru za následek nedostatek glukosy v jiných orgánech. Vysoká hladina IGF-2 tedy navozuje hypoglykemický stav, který je spojen s energetickým hladověním buněk. Nedostatek energie v nervových buňkách se projevuje změnou chování, ztrátou sebekontroly, a může dojít až k bezvědomí a následné smrti. Při tomto druhu hypoglykemie je insulinový receptor IR-A aktivován interakcí s IGF-2, což zabraňuje jeho interakci s insulinem. Na rozdíl od běžné hypoglykemie není ten stav spojen se zvýšenou hladinou insulinu, protože IGF-2 tlumí jeho sekreci. Navíc nervová soustava není v tomto stavu schopna využívat ketolátky jako zdroj energie. [26]. Výzkum antagonistů IGF-2 či inhibice exprese genu pro IGF-2 má potenciál v léčbě nádorů a hypoglykemie.

## 1.5 IGFBP

Je známo šest IGFBP (z *angl.* IGF-binding protein) označovaných IGFBP1-6. Slouží jako transportéry obou IGF a regulují jejich činnost tím, že váží volné IGF z krve, a ty přestávají být aktivní. Navíc také prodlužují poločas života IGF. Za normálního stavu je až 99 % růstových faktorů IGF vázáno na tyto proteiny a k jejich uvolnění dochází degradací vazebného proteinu. Nejvíce je zastoupen IGFBP3, který tvoří až 95 % všech IGFBP.

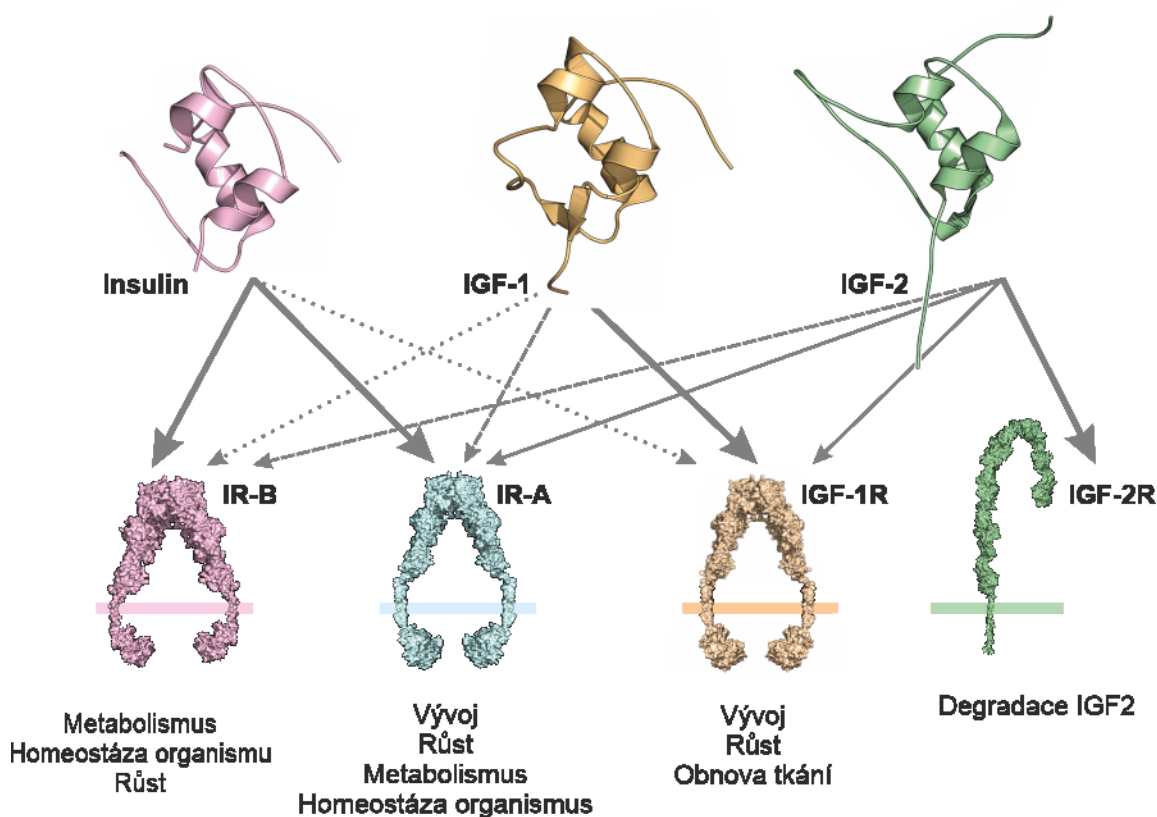
Savčí IGFBP jsou velké kolem 20 až 30 kDa a obsahují tři domény podobné velikosti. N-koncové a C-koncové sekvence jsou v rámci IGFBP konzervované a slouží k vazbě IGF. Střední část proteinu se liší, podléhá posttranslačním modifikacím a může obsahovat specifická místa, díky kterým má pak protein i svou vlastní aktivitu. Na syntézu IGFBP mají pravděpodobně vliv nutriční faktory a jejich syntéza je inhibována insulinem. IGFBP jsou sekretovány v částečně fosforylované formě, která má vyšší afinitu k IGF než forma nefosforylovaná. Například u IGFBP1 bylo objeveno 5 fosforylačních míst a v případě, že některá byla účelně defosforylována, došlo ke změnám v metabolismus IGF-1. Přítomnost fosfátů na IGFBP má možnou souvislost se vznikem diabetu mellitu druhého typu a některých kardiovaskulárních chorob [24].

## 1.6 Receptory interagující s IGF proteiny

Receptory jsou důležité v kontrole a regulaci aktivity obou IGF, protože tkáň může podléhat efektům těchto faktorů nebo insulinu pouze v případě, že její buňky obsahují na svém povrchu vhodné receptory. Oba IGF a insulin jsou schopny interagovat s receptory,

kteřé jsou spojeny s tyrosinovými kinasami. Jedná se o dvě isoformy insulinového receptoru IR-A a IR-B lišící se pouze o 12 aminokyselin v  $\alpha$ -CT peptidu a IGF-1R. Tyto receptory využívají podobných signalizačních drah, které však mají kvůli drobným rozdílům nakonec odlišné biologické účinky [22]. IGF-2R, také známý jako manosa-6-fosfátový (M6P) receptor, je strukturně odlišný od tyrosinkinasových receptorů a teprve v nedávné době u něj byla prokázána signalizační aktivita přes ERK (z *angl.* extracellular signal-regulated kinases) dráhu [28].

IR a IGF-1R jsou allosterické enzymy tvořené dimery heterodimerů obsahující dvě extracelulární alfa podjednotky a dvě transmembránové beta podjednotky spojené disulfidickými můstky, které mají tyrosinkinasovou aktivitu [22]. Pochopení struktury jednotlivých receptorů je klíčové pro přípravu analogů insulinu s převládajícím metabolickým efektem.



**Obr. 7:** Schéma přehledně znázorňující možné interakce insulinu a IGF s jednotlivými receptory. Síla šipek vyjadřuje sílu afinity ligandu k danému receptoru.

### 1.6.1 Insulinový receptor (IR-A, IR-B)

Insulinový receptor (IR, z *angl.* insulin receptor) zprostředkovává efekt insulinu na cílovou buňku. Gen pro IR se v lidském organismu nachází na chromozomu 19 a obsahuje 22 intronů a 22 exonů. Molekula IR je syntetizována ve formě preproreceptoru o délce 1380 aminokyselin a je glykosylována v endoplazmatickém retikulu a sbalována pomocí chaperonů a dále posttranslačně upravena. Díky těmto úpravám vznikají dvě isoformy IR lišící se pouze 12 aminokyselinami na C-konci extracelulární alfa podjednotky v tzv.  $\alpha$ -CT segmentu. Isoforma IR-A je o 12 aminokyselin delší než IR-B. Většina tkání obsahuje oba typy insulinového receptoru, ale liší se jejich množstvím podle převládající funkce dané tkáně.

Insulinový receptor je transmembránový glykoprotein tvořený symetrickými dimery. Obsahuje dvě extracelulární alfa podjednotky a dvě transmembránové beta podjednotky navzájem spojené třemi disulfidickými můstky. Beta podjednotky v intracelulární oblasti vytváří doménu s tyrosinkinasovou aktivitou (viz Obr. 9, str. 17). Každá alfa podjednotka obsahuje od N-konce k C-konci doménu L1 bohatou na leucin, doménu CR bohatou na cystein, další doménu bohatou na leucin L2 a tři domény tvořené fibronectinem typu 3 (viz Obr. 8, str. 16). Interakce alfa podjednotky s ligandem způsobuje změnu konformace a stimuluje tyrosinkinasovou aktivitu intracelulární části beta podjednotky. Klíčovou oblastí pro interakci receptoru s insulinem je elektronově bohatá C-koncová část jedné z alfa podjednotek označovaná jako  $\alpha$ -CT peptid spojující obě alfa podjednotky [22].

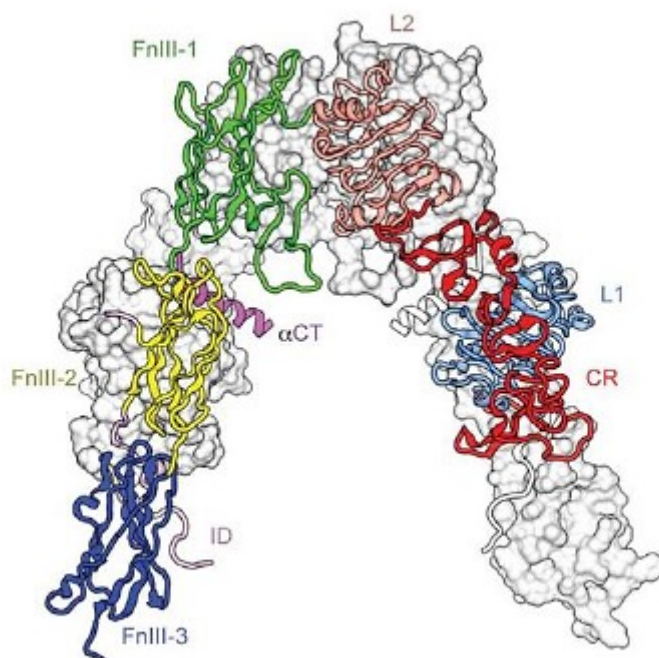
Byly zjištěny dva způsoby signalizace přes insulinový receptor. Po navázání ligandu je receptor schopný fosforylovat intracelulární proteiny nacházející se v jeho okolí, např. IRS (z *angl.* insulin receptor substrate), Shc nebo Gab1. Tyto fosforylované proteiny aktivují další signální molekuly, což má za následek spuštění jedné ze dvou možných signálních kaskád. Přes receptor IR-B je aktivována fosfoinositol-3-kinasa, která dává vzniknout PI3, který pomocí dalších kinas fosforyluje proteinkinasu B neboli Akt (z *angl.* thymomas of AKR mice). Tato signální kaskáda nakonec vede k metabolickým účinkům, např. k syntéze glykogenu, tvorbě GLUT-4 transportéru zodpovědného za průchod glukosy přes cytoplazmatickou membránu do buněk, regulaci proteosyntézy a také regulaci apoptosy. IR-B receptoru je nejvíce v tkáních aktivně se podílejících na metabolismu, jakou jsou játra, svalový aparát nebo tuková tkáň [28][29].

Naopak signalizace přes IR-A způsobí fosforylaci ERK (z *angl.* extracellular signal-regulated kinases) proteinu neboli MAP kinasy (z *angl.* mitogen-activated protein), který je

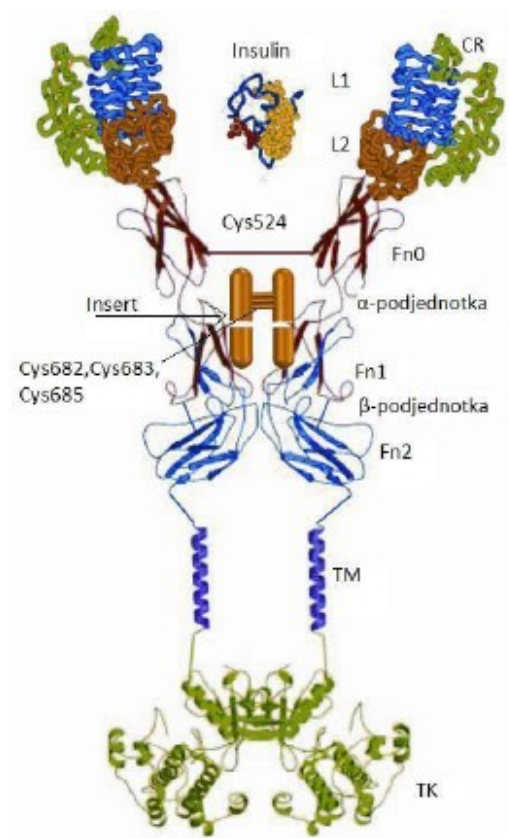


schopný aktivovat řadu transkripčních faktorů a má tedy mitogenní efekt. IR-A se ve velké míře nachází v embryonální tkáni, kostní dřeni a rakovinných buňkách [29]. IGF-2 je schopen signalizovat přes IR-A, zatímco k IR-B má nízkou afinitu (viz Obr. 7, str. 14).

Předpokládá se, že chyba v těchto kaskádách fosforylací je příčinou insulinové rezistence. Insulinová rezistence je omezena pouze na metabolickou dráhu a naopak posiluje mitogenní signalizaci. Snaha organismu kompenzovat tuto rezistenci, při které dochází ke špatnému odstraňování glukosy z krve, vede k nadměrné produkci insulinu z beta buněk Langerhansových ostrůvků, což stimuluje aktivitu růstových faktorů a může vést ke vzniku nádorů [30].



**Obr. 8:** Struktura extracelulární alfa podjednotky insulinového receptoru IR-A s barevně označenými doménami jednoho monomeru alfa podjednotky. L1 a L2 jsou domény bohaté na leucin, CR je doména bohatá na cystein, FnIII 1-3 jsou fibronectinové domény, ID je insertní doména, fialově je vyznačen  $\alpha$ -CT peptid. Druhý monomer je znázorněn bíle pouze jako elektronová hustota. Převzato z [45].



**Obr. 9:** Znáznornění prostorové struktury IR v porovnání s velikostí molekuly insulínu. Z obrázku je patrná dimerní struktura tohoto receptoru. Jsou zde opět vyznačeny jednotlivé domény alfa podjednotky: CR jsou domény bohaté na cystein, L1 a L2 jsou leucinové domény, FnIII 1-3 jsou domény tvořené fibronektinem III. TM znázorňuje transmembránovou část receptoru. Zeleně je vyznačená tyrosinkinasová doména. Převzato a upraveno z [46].

Nedávno bylo objeveno, že důležitý pro interakci s receptorem je C-konec B řetězce insulínu, konkrétně aminokyseliny B20-B27, které se musí při interakci s vazebným místem otočit přibližně o 50°, aby správně zapadly mezi beta list L1 domény a část  $\alpha$ -CT peptidu (viz Obr. 8, str. 16), a tím odhalí N-konec řetězce A. Tento objev je velmi užitečný při vytváření insulínových analogů. Protože je IR dimerní, obsahuje dvě shodná vazebná místa pro insulin, ale za fyziologických podmínek váže pouze jednu molekulu insulínu. Na insulínu byla nalezena dvě oddělená místa interagující s insulínovým receptorem. Vazebné místo 1 je tvořené aminokyselinami GlyA1, ValA3, GlnA5, TyrA19, LeuB11, ValB12, GluB15, PheB24 a PheB25. Vazebné místo 2 obsahuje aminokyseliny SerA12, LeuA13, GluA17, HisB10, GluB13 a LeuB17. Odpovídající vazebná místa na receptoru leží v jeho extracelulární části, konkrétně vazebné místo 1 receptoru se nachází v L1 oblasti a

interaguje se vazebným místem 1 na insulinu. Vazebné místo 2 na receptoru se nachází v doméně tvořené fibronektinem III a interaguje s vazebným místem 2 insulinu [31][22].

### **1.6.2 IGF-1 receptor**

Biologická aktivita obou IGF je řízena zejména přes receptor IGF-1 receptor (IGF-1R). Je důležitý zejména pro regulaci růstu a správnou diferenciaci buněk v embryonálním vývoji. IGF-1R je svou strukturou velmi podobný insulinovému receptoru. Je to také homodimer, stejně jako IR. Obsahuje dvě extracelulární podjednotky a dvě podjednotky transmembránové [17][32]. Různou afinitu IGF-1 a insulinu k IGF-1R a IR způsobuje mírně odlišný vazebný mód této interakce, kdy se při vazbě uplatňují jiné domény z extracelulární části receptoru. Transmembránové podjednotky jsou velmi podobné IR. Mají také tyrosinkinasovou aktivitu, kterou spouští Akt nebo ERK signalizační kaskády, které ale téměř vždy vedou k mitogennímu efektu [33]. Tento receptor má větší afinitu k IGF-1 než k IGF-2, ale je schopen tvořit komplex s oběma IGF. Za vysokou afinitu IGF-1R k růstovým faktorům je zodpovědná jejich doména C. Insulin doménu C nemá, a proto afinita tohoto receptoru k insulinu je velmi nízká [34]. Změny ve struktuře IGF-1R způsobují změnu jejich afinity a mohou vést k metabolickým poruchám. Je dokázáno, že těmto změnám podléhají receptory ve svalové tkáni obézních lidí [24].

### **1.6.3 Hybridní receptory**

Z důvodu vysoké homologie IR a IGF-1R vznikají v organismu velmi často hybridní receptory složené z jednoho monomeru IGF-1R a jednoho monomeru IR-A či IR-B. V některých tkáních, např. v srdci či svalech, byla zjištěna převaha těchto hybridních receptorů nad IGF-1R a IR. IGF se na hybridní receptory váže s podobnou afinitou jako na IGF-1R, zatímco insulin má k těmto receptorům daleko nižší afinitu [35]. Jejich biologická funkce zatím nebyla zjištěna.

### **1.6.4 IGF-2 receptor**

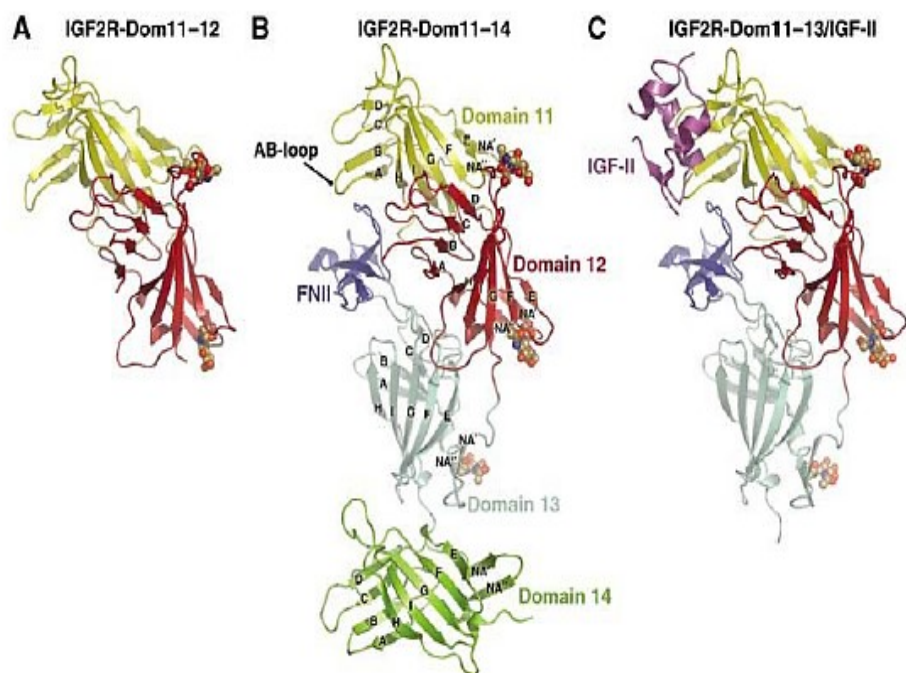
IGF-2 receptor (IGF-2R), také známý jako manosa-6-fosfátový (M6P) receptor, je na rozdíl od IGF-1R a IR monomerní (podle některých studií možná homodimerní) transmembránový glykoprotein velký asi 300 kDa. Na N-konci je tvořen 15 topologicky podobnými extracelulárními doménami, které jsou přes jeden transmembránový protein spojené s krátkou C-koncovou intracelulární doménou. Tyto vnější domény jsou bohaté na cystein. Z aminokyselinové analýzy se předpokládá, že všechny extracelulární domény mají tvar beta barelu, u domén 1, 2, 3 a 11 je to dokonce i experimentálně potvrzeno. U

těchto domén byla zjištěna struktura beta barelu složeného ze dvou čtyřřetězcových antiparalelně orientovaných beta listů propojených čtyřmi disulfidickými můstky [21].

Tento receptor se vyskytuje ve všech lidských tkáních, kde koluje v klathrinových váčcích mezi buněčným povrchem a trans-Golgiho komplexem [36][37]. Samotná biologická aktivita IGF je zajišťována zejména IGF-1R a insulinovým receptorem. Signalizační funkce IGF-2R není zatím zcela přesně prozkoumána. Předpokládalo se, že žádnou signalizační funkci vůbec nemá. Podle posledních dat však IGF-2 může vyvolávat ERK signalizaci i přes tento receptor [28]. Zablokováním vazebných míst pro IGF-2 na IGF-2R specifickými protilátkami bylo zjištěno, že činnost tohoto receptoru se uplatňuje během degradace IGF-2, zprostředkovává jeho transportován do lysozomů, kde je následně rozštěpen. Z toho vyplývá, že jednou z funkcí IGF-2R může být inhibice růstu. Podílí se také na transportu lysozomálních enzymů z trans-Golgiho systému do lysozomů [38].

IGF-2R obsahuje místo pro vazbu ligandů obsahujících manosu-6-fosfát, tímto místem jsou domény 3, 5 a 9 [39]. Částí receptoru zajišťující vazbu s IGF-2 je doména 11. Pomocí rentgenostrukturní analýzy byla zjištěna prostorová struktura domény 11. Ta obsahuje hydrofobní kapsu, která interaguje s Phe<sup>19</sup> a Leu<sup>53</sup> IGF-2. Doména 13 reguluje afinitu receptoru k IGF-2 a prostorově umožňuje jeho navázání [40][41]. Pomocí heteronukleární NMR byla zjištěna struktura komplexu domény 11 s navázaným IGF-2 (viz Obr. 10 C, str. 20) [21].

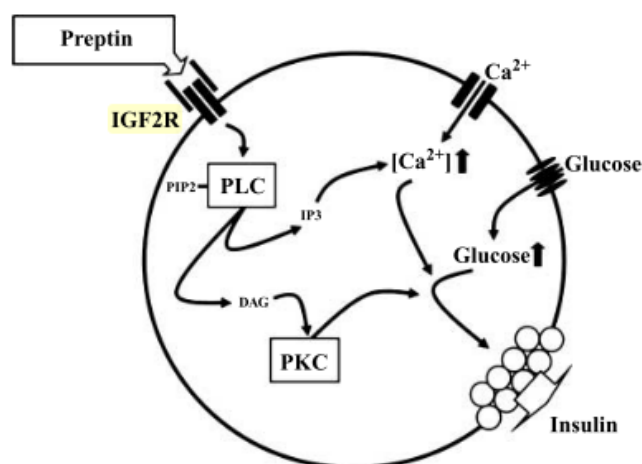
Stejně jako exprese IGF-2 je i exprese IGF-2R ovlivněna epigeneticky umlčením genu (tzv. imprinting). Na rozdíl od genu pro IGF-2 je zde exprimována mateřská alela. Jsou-li aktivní obě alely, dochází k nadměrné tvorbě tohoto receptoru. Expresce tohoto receptoru probíhá nejvíce v prenatálním období. Aktivita IGF-2R je zvýšená v případě obezity a naopak snižena vlivem snížené exprese u pacientů s některými druhy rakoviny. V takovém případě se neodbourává IGF-2 a jeho zvýšená hladina je zodpovědná za některé druhy karcinomů. Díky možnosti degradovat IGF-2 je tento receptor tumor supresivní a je považován za potenciální metodu terapie nádorů. Insulin stimuluje vazbu IGF-2 na tento receptor, zejména v tukových a jaterních buňkách. IGF-2R není schopen interagovat s insulinem a má jen velmi malou afinitu k IGF-1 [18][42].



**Obr. 10:** Znáznornění struktury některých extracelulárních domén IGF-2 receptoru.

A – struktura IGF-2R domény 11 a 12; B – struktura IGF-2R domény 11-14; C – struktura domén 11,12 a 13 s navázaným IGF-2 (fialově vyznačen) na doménu 11 (žlutě). Převzato z [43].

Jak bylo již řečeno, receptor preptinu zatím nebyl nalezen. Pravděpodobně by preptin mohl fungovat přes IGF-2R aktivací PLC/PKC (z *angl.* phospholipase C/ phosphokinase C) dráhy, která při vyšší hladině glukosy v krvi způsobí zvýšení koncentrace vápenatých iontů a následné uvolnění insulinu ze sekrečních granulí (viz Obr. 11). Při použití inhibitorů PLC a PKC došlo ke snížení sekrece insulinu a stejný efekt vykazuje i zablokování IGF-2R [44].



**Obr. 11:** Schéma možného působení preptinu na glukosou stimulovanou sekreci insulinu přes IGF-2R receptor. Převzato z [44].

## **2 Cíl práce**

- Příprava lidského a potkaního preptinu syntézou peptidů na pevné fázi
- Testování vlivu preptinu na glukosou stimulovanou sekreci insulinu
- Testování vazebné afinity preptinu k IGF-1R a IR-A
- Určení struktury preptinu metodou cirkulárního dichroismu

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Použité chemikálie

Acetonitril, Fischer Scientific, Leics, UK  
D-glukosa, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo  
Diethylether, Penta, Chrudim, ČR  
Dichlormethan (DCM), Penta, Chrudim, ČR  
DMEM médium, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo  
DODT, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo  
EDTA, Lachema, Brno, ČR  
Fenol, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo  
Fetální hovězí sérum (FBS), Invitrogen, Carlsbad, USA  
HEPES, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo  
Hovězí sérový albumin (BSA), Invitrogen, Carlsbad, USA  
Hydroxid sodný, Penta, Chrudim, ČR  
Chlorid sodný, Penta, Chrudim, ČR  
Chlorovodíková kyselina, Penta, Chrudim, ČR  
<sup>125</sup>I-IGF-1, Perkin Elmer, USA  
L-glutamin, Invitrogen, Carlsbad, USA  
Lidský insulin <sup>125</sup>I na Tyr<sup>A14</sup> (monomer), Perkin Elmer, USA  
*N,N*-dimethylformamid (DMF), Fischer Scientific, Leics, UK  
*N*-Fmoc chráněné aminokyseliny, Novabiochem Merck, Darmstadt, Německo  
Octová kyselina, 99%, Penta, Chrudim, ČR  
Piperidin, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo  
Puromycin, Gibco, USA  
RPMI médium, Invitrogen, Carlsbad, USA  
Thioanisol, Fluka, Buchs, Švýcarsko  
Trifluoroctová kyselina (TFA), Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo  
Triisopropylsilan, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo  
Trypsin, *TPCK*, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo  
Wangova pryskyřice, Novabiochem Merck, Darmstadt, Německo  
Ostatní běžně používané chemikálie byly zakoupeny ve firmě Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo. Destilovaná voda byla vyrobena přímo v ÚOCHB AV ČR.

### **3.2 Použité buněčné linie**

INS-1E, potkaní beta buňky, poskytnuty Dr. Pierre Maechlerem, University Medical Center, Švýcarsko

IM-9, lidské B-lymfoblasty transformované virem Epstein-Barrové odvozené z mnohočetného myelomu, exprimují pouze IR-A, ATCC, USA

R<sup>+</sup>, myší embryonální fibroblasty s transfekovaným lidským IGF-1R, poskytnuty prof. Antoninem Belfiorem, Itálie

### **3.3 Použité přístroje**

Centrifuga Rotoxif 32 A, Schoeller, Německo

Flow-Box Envair Eco Air V, ENVAIR Deutschland, GmbH, Emmendingen, Německo

Inkubátor MCO 170AIC Panasonic, Schoeller, Německo

Hmotnostní spektrometr LTQ Orbitrap XL, Thermo Fisher Scientific, UK

Lyofilizátor Heto FD3, Dánsko

Membránová vývěva MZ 2C NT, Vacuubrand, Wertheim, Německo

Optický mikroskop Axiovert 40 CFL, Zeiss, Německo

pH metr 827 pHLab, Metrohm, Švýcarsko

RIA kit EMD Millipore Corporation, Německo

RP-HPLC Waters 600 Controller; Waters, USA

Spektrofotometr Lambda 25, Perkin-Elmer, USA

Spyder Mark III, prototyp, ÚOCHB AV ČR

Stolní centrifuga MiniSpin<sup>®</sup>, Eppendorf, Německo

Teploměr s čidlem, Friotemp Digital Thermometer 30 700, Sigma-Aldrich, Německo

Ultracentrifuga Jouan CR3i, Thermo Electron Corporation, Francie

UV-VIS detektor pro RP-HPLC Waters 2487; Waters, USA

Vortex, VELD Scientifica, Itálie

γ počítač Wizard 2<sup>®</sup> 2470 Automatic Gamma Counter, Perkin-Elmer, USA



### 3.4 Příprava preptinu

#### 3.4.1 Automatická syntéza na pevné fázi

Všechny peptidy byly připraveny metodou syntézy na pevné fázi podle Merrifielda. Syntéza byla provedena pomocí automatického syntetizátoru Spyder Mark III. Syntéza probíhala v plastové stříkačce s fritou na Wangově pryskyřici a  $\alpha$ -aminoskupiny byly chráněny Fmoc skupinou. K chránění postranních skupin aminokyselin byl použit *t*Bu. Fmoc byl odštěpován pomocí piperidinu a DMF v poměru 1 : 5. Po ukončení syntézy byla pryskyřice s připravenými peptidy několikrát důkladně promyta DCM. Peptid byl štěpen z pryskyřice při současném odštěpení chránících skupin postranních řetězců ve 3 ml štěpící směsi po dobu 2 hodin (na 10 ml štěpící směsi: 10 ml TFA, 0,25 ml H<sub>2</sub>O, 0,25 ml thioanisolu, 0,129 ml DODT, 0,25 g fenolu, 0,2 ml TIS) za občasného míchání. Následně byl peptid vysrážen diethyletherem. Směs byla stočena 15 minut při 8000 × g a promyta 0,1% TFA. Poté byl opět přidán diethylether, směs byla znovu stočena a peleta vysušena v exsikátoru.

### 3.5 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC)

#### 3.5.1 Analytické provedení RP-HPLC

Identifikace připravených peptidů byla prováděna pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na přístrojích společnosti Waters. Analytické provedení RP-HPLC bylo využito ke stanovení čistoty připravených molekul. K analýze látek byla použita kolona Nucleosil 120-5 C18, 250 × 4 mm od výrobce Macherey-Nagel s průtokem 1 ml/min. Naměřená data byla zpracována v programu Clarity Lite Data Apex, ČR. Před analýzou na HPLC byly vzorky vždy rozpuštěny v roztoku 10% kyselina octová a 80% acetonitril v poměru 2 : 1 tak, aby výsledná koncentrace byla přibližně 1 mg/ml. Jako mobilní fáze byly použity roztok A (0,1% TFA ve vodě) a roztok B (80% acetonitril s 0,1% TFA ve vodě). Eluce látek byla prováděna pomocí stoupající koncentrace roztoku B (viz Tab. 1). Peptidy byly detekovány na základě absorpce záření o vlnových délkách 276 a 218 nm.

**Tab. 1:** Gradient elučního roztoku používaný při analytické RP-HPLC na koloně Nucleosil 120-5 C18, 250 × 4 mm společnosti Macherey-Nagel. Průtok 1 ml/min.

	Gradient					
Čas [min]	0	1	21	34	37	37,1
Koncentrace B [%], (v/v)	10	35	45	55	90	10

### 3.5.2 Preparativní RP-HPLC

K preparaci a následné purifikaci připravených peptidů byla také použita metoda RP-HPLC na přístrojích firmy Waters. Pro preparaci byla použita preparativní kolona Nucleosil 120-5 C18, 250 × 21 mm společnosti Macherey-Nagel s průtokem 9 ml/min. Jako složky mobilní fáze byly použity roztok A (0,1% TFA ve vodě) a roztok B (80% acetonitril s 0,1% TFA ve vodě). Eluce látek byla prováděna pomocí stoupající koncentrace roztoku B (viz Tab. 2).

**Tab. 2:** Gradient elučního roztoku použitý při preparativní RP-HPLC na preparativní koloně Macherey-Nagel Nucleosil 120-5 C18, 250 × 21 mm. Průtok 9 ml/min.

	Gradient		
Čas [min]	0	30	31
Koncentrace B [%], (v/v)	10	100	10

### 3.6 Hmotnostní spektrometrie

Kontrola všech produktů syntézy na pevné fázi byla provedena v Laboratoři hmotnostní spektrometrie v ÚOCHB AV ČR na přístroji LTQ Orbitrap XL společnosti Thermo Fisher Scientific metodou ESI (z *angl.* electrospray ionization) nebo MALDI (z *angl.* matrix-assisted laser desorption/ionization) v pozitivním módu.

### 3.7 Testování vlivu preptinu na sekreci insulinu

#### 3.7.1 Příprava roztoků preptinu pro testování sekrece insulinu

Pro testování sekrece insulinu byl použit celý potkaní preptin a také jeho dva fragmenty 1-16 AMK a 17-34 AMK. Po purifikaci na RP-HPLC byly pro testování sekrece insulinu připraveny 1mM zásobní roztoky těchto peptidů naředěné 0,1% kyselinou octovou. Přesná koncentrace byla zkontrolována spektrometricky na spektrofotometru Lambda 25 při vlnové délce 280 nm. Extinkční absorpční koeficienty pro jednotlivé látky byly stanoveny ze vztahu:  $\epsilon_{280} = n \cdot \text{Trp } 5500 + n \cdot \text{Tyr } 1490$ , kde  $n$  je počet daných aminokyselin v primární sekvenci peptidu.

Před samotným testováním byly 1mM zásobní roztoky ředěny na výsledné koncentrace  $10^{-4}$  až  $10^{-6}$  M čerstvým KRBH puforem bez glukosy o složení: 20mM HEPES, 119mM NaCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 5mM NaHCO<sub>3</sub>, 4,6mM KCl, 1mM MgSO<sub>4</sub>, 0,4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,15mM

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a 0,250 g 0,05% hovězího sérového albuminu. pH pufru bylo upraveno na hodnotu 7,4.

### **3.7.2 Příprava buněk INS-1E pro testování sekrece insulinu**

Ke stanovení sekrece insulinu v přítomnosti preptinu a glukosy byla použita buněčná linie potkaních pankreatických beta buněk INS-1E. Buňky byly skladovány v kapalném dusíku. Před použitím byly rozmrazeny ve vodní lázni o teplotě 37 °C a převedeny do 7 ml média pro kultivaci INS-1E o složení: 85% (v/v) RPMI 1640, 10% (v/v) fetální hovězí sérum, 1% (v/v) L-Gln, 1% (v/v) penicilin, 1% (v/v) HEPES, 1% (v/v) pyruvát sodný a 50  $\mu\text{M}$  beta-merkapt ethanol. Směs byla centrifugována 5 minut při zrychlení  $230 \times g$  a laboratorní teplotě. Poté se médium odlilo a peleta buněk byla resuspendována v 15 ml čistého média a buňky byly převedeny do kultivační lahve. Následně se nechaly kultivovat v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5% (v/v)  $\text{CO}_2$  a byly každý týden pasážovány. Po týdnu bylo odebráno médium a buňky byly opláchnuty médiem bez séra. Buňky se odlepily ze dna kultivační lahve přidáním 3 ml trypsinu. Po pětiminutové inkubaci při 37 °C k nim bylo přidáno 12 ml média se sérem pro zastavení účinku trypsinu. Po promíchání bylo odebráno 100  $\mu\text{l}$  suspenze buněk a buňky byly spočítány v Bürkerově komůrce a zředěny médiem na výslednou koncentraci 1 000 000 buněk/ml.

### **3.7.3 Sekrece insulinu**

Testování sekrece insulinu bylo provedeno na 24-jamkové destičce. Do každé jamky bylo aplikováno 100 000 buněk (100  $\mu\text{l}$ ), přidalo se 900  $\mu\text{l}$  DMEM kompletního média a destička byla ponechána v inkubátoru při 37 °C a 5% (v/v)  $\text{CO}_2$ . Po třech dnech bylo kompletní médium odebráno a nahrazeno médiem bez glukosy, se kterým byly buňky inkubovány po dobu 2 hodin ve stejných podmínkách. Po inkubaci byly 2krát promyty KRBH pufrům bez glukosy a následně inkubovány 1 hodinu při 37 °C a 5% (v/v)  $\text{CO}_2$  s 1 ml tohoto pufru. Po inkubaci byla k buňkám do jamek v duplikátech přidána daná koncentrace D-glukosy, respektive 2mM D-glukosa a 10nM a 100nM potkaní preptin či jeho fragmenty, za účelem sekrece insulinu. Reakce probíhala 1 hodinu při 37 °C a 5%  $\text{CO}_2$ , poté byla zastavena přendáním destičky na led. Roztok z jamek byl na ledu odebrán do zkumavek typu Eppendorf a stočen 5 minut při  $500 \times g$  a 4 °C. Supernatant byl odebrán a použit ke stanovení insulinu metodou RIA a ke stanovení vazebné afinity preptinu k IR-A a IGF-1R.

### 3.7.4 Radioimunologické stanovení (RIA)

Všechny chemikálie a pufrы použité během radioimunologického stanovení byly součástí kitu pro RIA od společnosti EMD Millipore Corporation, Německo. Součástí kitu je stanovovací pufr o složení: 0,05M fosfosalin, 0,025M EDTA, 0,08% azid sodný, 1% BSA, dále purifikovaný potkaní insulin o koncentraci 1 ng/ml sloužící jako standard, poté morčecí antisérum proti potkanímu insulinu a kontroly kvality stanovení (QC 1, QC 2),  $^{125}\text{I}$ -insulin, srážecí reagens obsahující sekundární kozí protilátku proti morčecímu IgG, 3% PEG a 0,05% Triton X-100 v 0,05M fosfalinu, 0,025M EDTA a 0,08% azidu sodném, a hydratační pufr označený morčecím IgG.

Po odstředění byl supernant 40krát naředěn stanovovacím pufrem na celkový objem 200  $\mu\text{l}$ . Pomocí purifikovaného potkaního insulinu o koncentraci 1 ng/ml se připravily kalibrační roztoky o celkovém objemu 0,5 ml a koncentracích 0,5 ng/ml, 0,25 ng/ml, 0,125 ng/ml, 0,0625 ng/ml a 0,0313 ng/ml. K ředění byl použit opět stanovovací pufr. Následně se postupovalo podle tabulky Tab. 3. Do jednotlivých zkumavek se pipetovalo 100  $\mu\text{l}$  standardů, respektive 100  $\mu\text{l}$  QC nebo 100  $\mu\text{l}$  vzorků. Poté bylo do každé zkumavky přidáno 100  $\mu\text{l}$  stanovovacího pufru a 100  $\mu\text{l}$  protilátky proti potkanímu insulinu.

**Tab. 3:** Příprava standardů a vzorků pro radioimunologické stanovení

	Stanovovací pufr	Standard/QC/vzorek	Protilátka proti potkanímu insulinu
1	-	-	-
2	300 $\mu\text{l}$	-	-
3	200 $\mu\text{l}$	-	100 $\mu\text{l}$
4	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$ 0,0313 ng/ml	100 $\mu\text{l}$
5	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$ 0,0625 ng/ml	100 $\mu\text{l}$
6	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$ 0,125 ng/ml	100 $\mu\text{l}$
7	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$ 0,25 ng/ml	100 $\mu\text{l}$
8	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$ 0,5 ng/ml	100 $\mu\text{l}$
9	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$ 1 ng/ml	100 $\mu\text{l}$
10	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$ QC 1	100 $\mu\text{l}$
11	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$ QC 2	100 $\mu\text{l}$
12-35	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$ vzorku	100 $\mu\text{l}$

Takto připravené standardy, vzorky a kontroly kvality (QC 1, QC 2) se krátce promíchaly a nechaly inkubovat 20 až 24 hodin při teplotě 4 °C. Po uplynutí inkubační doby se do všech zkumavek přidalo 100 µl insulínu značeného radioaktivním izotopem <sup>125</sup>I, který byl předem rozpuštěn v hydratačním pufru. Směs se opět nechala přibližně 24 hodin inkubovat při 4 °C. Stanovení probíhá formou kompetice při vazbě na protilátku mezi insulínem vyprodukovaným INS-1E buňkami na základě stimulace a radioaktivně značeným <sup>125</sup>I-insulínem. Třetí den byl přidán 1,0 ml sekundární protilátky proti morčecímu IgG sloužící ke vzniku precipitátu s protilátkou proti insulínu. Po 20 minutách inkubace ve 4 °C se směs odstředila 20 minut při 500 × g a 4 °C. Následně byl opatrně odlit supernatant a peleta tvořená precipitátem v každé zkumavce se měřila 60 sekund na γ počítači Wizard 2<sup>®</sup> 2470 Automatic Gamma Counter, Perkin-Elmer, USA.

Vyhodnocení množství sekretovaného insulínu bylo provedeno na základě porovnání s kalibrační křivkou naměřenou pomocí standardů o známých koncentracích neznačeného insulínu. Získaná data byla analyzována a vyhodnocena v programu GraphPad Prism 8.0 metodou nelineární regrese podle modelu vazby do jednoho vazebného místa (z anglického označení „one site fitting model“).

### **3.8 Testování vazebné afinity preptinu k IR-A**

Ke stanovení vazebné afinity preptinu k IR-A byla použita buněčná linie IM-9 lidských lymfocytů exprimujících výhradně tento druh receptoru.

#### **3.8.1 Příprava buněk pro vazebné testy**

Buňky IM-9 byly kultivovány 4 dny v médiu RPMI-1640 obsahujícím 100 IU/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu, 10% (w/w) FBS a 2mM L-Gln (vše od společnosti Invitrogen, Carlsbad, USA) v inkubátoru při 37 °C a 5% (v/v) CO<sub>2</sub>. Po kultivaci byly buňky s médiem přemístěny z kultivační lahve do plastových falkon a stočeny po dobu 5 minut při 260 × g v centrifuze Rotofix 32 A, Schoeller. Supernatant byl odlit a peleta buněk byla resuspendována v 10 ml HBB vazebného pufru o složení: 100mM HEPES, 100mM NaCl, 5mM KCl, 1,3mM MgSO<sub>4</sub>, 1mM EDTA, 10mM glukosa, 15mM octan sodný a 1% hovězí sérový albumin, upraveného na pH 7,6. Následně bylo odebráno 500 µl suspenze buněk pro počítání a smícháno s 450 µl 0,1% Trypan Blue barviva pro označení usmrcených buněk. Buňky byly počítány v Bürkerově komůrce a zředěny na koncentraci 2.10<sup>6</sup> buněk/ml. Následně byly dány do vodní lázně o teplotě 15 °C.

### 3.8.2 Stanovení vazebné afinity preptinu k IR-A

Pro stanovení vazebné afinity byly použity vzorky o koncentraci preptinu či jeho fragmentů  $10^{-5}$  až  $10^{-11}$  M. Reakce probíhala ve vazebném pufru HBB. Během testování bylo ve všech vzorcích zachováno konstantní množství buněk i radioaktivně značeného insulinu, ale postupně byla zvyšována koncentrace testované látky. Testování vazebné afinity probíhá formou kompetice mezi radioaktivně značeným insulinem  $^{125}\text{I}$  na Tyr<sup>A14</sup> a preptinem o vazbu na receptor. Do každé zkumavky bylo přidáno vždy 50  $\mu\text{l}$  zvyšující se koncentrace preptinu a konstantní množství (50  $\mu\text{l}$ ) insulinu označeného radioaktivním izotopem  $^{125}\text{I}$  upraveného na aktivitu 20 000 cpm a nakonec 400  $\mu\text{l}$  suspenze buněk o koncentraci  $2 \cdot 10^6$  buněk/ml. Celkový objem reakční směsi byl tedy 500  $\mu\text{l}$ . Reakce probíhala při teplotě 15 °C po dobu 2,5 hodin a každých 30 minut byly zkumavky promíchány. Po uplynutí inkubační doby byla z každého vzorku vytvořena dvojice vzorků o objemu 200  $\mu\text{l}$ . Ke každému vzorku bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  vychlazeného vazebného pufru HBB pro zastavení reakce. Následně byla směs stočena 5 minut při  $15\,000 \times g$  a teplotě 4 °C. Po odstředění byl supernatant odsát pomocí membránové pumpy a peleta byla ponechána v Beckmannově zkumavce a celá vložena do polystyrenové zkumavky pro měření radioaktivity. Radioaktivita byla měřena na  $\gamma$  počítací Wizard 2<sup>®</sup> 2470 Automatic Gamma Counter, Perkin-Elmer, USA po dobu 300 s na jednu zkumavku.

Získaná data byla analyzována a vyhodnocena v programu GraphPad Prism 8.0 metodou nelineární regrese podle modelu vazby do jednoho vazebného místa (z anglického označení „one site fitting model“).

### 3.9 Testování vazebné afinity preptinu k IGF-1R

K testování vazebné afinity preptinu k IGF-1R byla použita buněčná linie myších embryonálních fibroblastů R<sup>+</sup> s deletovaným genem pro myši IGF-1R a transfekovaným lidským genem pro IGF-1R.

#### 3.9.1 Příprava buněk pro vazebné testy

Buňky byly pěstovány v inkubátoru při teplotě 37 °C ve zvlhčené atmosféře s 5% (v/v) obsahem CO<sub>2</sub> v médiu s vysokým obsahem glukosy o složení: 87,6% (v/v) DMEM s 4,5 g/l glukosy, 10% (w/w) FBS, 2mM L-Gln, 100 IU/ml penicilinu, 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycinu a 3  $\mu\text{g/ml}$  puromycinu a třikrát týdně pasážovány. Den před testováním byly buňky nasazeny do 24-jamkových destiček v koncentraci 12000 buněk na jamku.

### 3.9.2 Stanovení vazebné afinity preptinu k IGF-1R

Testování vazebné afinity probíhá kompeticí mezi testovaným analogem a radioaktivně značeným  $^{125}\text{I}$ -IGF-1. Během testování je ve všech vzorkách zachováno konstantní množství radioaktivně značeného IGF-1 a postupně se zvyšuje koncentrace testované látky. Narostlé buňky byly dvakrát omyty HBB pufrům a do každé jamky byla pipetována reakční směs v pořadí – vazebný pufr, odpovídající koncentrace testovaných peptidů a radioaktivně značený  $^{125}\text{I}$ -IGF-1 s aktivitou 43 000 cpm. Reakce byla inkubována po dobu 16 hod při 4 °C za stálého třepání. Po ukončení inkubační doby byla reakční směs odsáta, buňky byly promyty vazebným pufrům a solubilizovány 0,1M NaOH. Roztok se solubilizovanými buňkami byl přenesen do zkumavek a byla změřena jeho radioaktivita pomocí  $\gamma$  počítače Wizard 2<sup>®</sup> 2470 Automatic Gamma Counter, Perkin-Elmer, USA. Každý vzorek byl měřen po dobu 60 s.

Získaná data byla analyzována a vyhodnocena v programu GraphPad Prism 5.0 metodou nelineární regrese podle modelu vazby do jednoho vazebného místa (z anglického označení „one site fitting model“).

### 3.10 Cirkulární dichroismus preptinu

Experimentální CD spektra preptinu byla měřena v Laboratoři cirkulárního dichroismu ÚOCHB AV ČR, Praha. Měření bylo provedeno na spektrometru JASCO J-815 v rozsahu vlnových délek přibližně 190 až 250 nm v 1mm skleněné kyvetě při skenovací rychlosti 5 nm/min a za laboratorní teploty. Výsledné CD spektrum je průměrem tří měření. Zásobní roztok lidského preptinu o koncentraci  $4,8 \cdot 10^{-4}$  M a potkaního preptinu o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4}$  M byl ředěn 10krát 20mM roztokem fosfátového pufru o pH 7 na konečné koncentrace  $4,8 \cdot 10^{-5}$  M, respektive  $5 \cdot 10^{-5}$  M. Kvůli příliš vysoké absorbanci vzorků se takto připravené roztoky ještě dvakrát ředily tím samým pufrům. Intenzita signálu byla přepočtena na molární cirkulární dichroismus  $\Delta\epsilon$ .

## 4 Výsledky

### 4.1 Příprava preptinu

#### 4.1.1 Automatická syntéza na pevné fázi

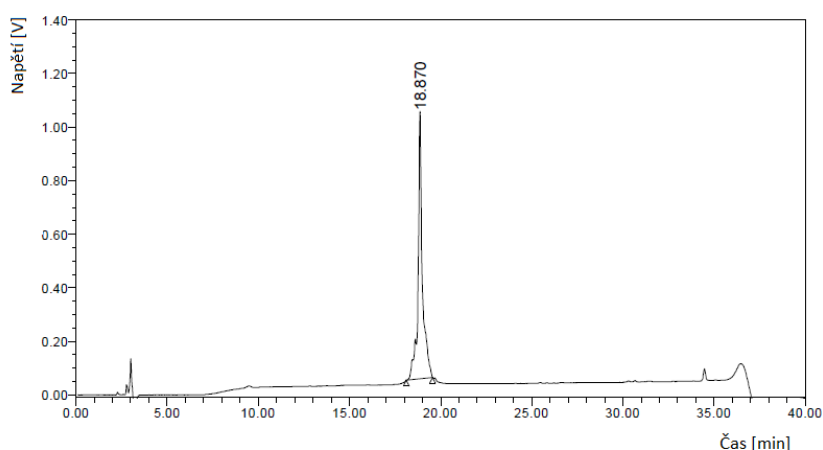
Automatickou syntézou peptidů na pevné fázi bylo připraveno celkem šest peptidů, lidský a potkaní preptin a jejich fragmenty (viz Tab. 4). Metoda byla provedena na Wangově pryskyřici s použitím chránění  $\alpha$ -aminoskupin Fmoc-skupinou. K chránění funkčních skupin postranních řetězců byl použit *t*Bu. Peptid byl z pryskyřice odštěpen štěpící směsí popsané v kapitole 3.4.1.

**Tab. 4:** Peptidy připravené automatickou syntézou na pevné fázi.

Potkaní preptin	Lidský preptin
Celý (1-34 AMK)	Celý (1-34 AMK)
Fragment 1 (1-16 AMK)	Fragment 1 (1-16 AMK)
Fragment 2 (17-34 AMK)	Fragment 2 (17-34 AMK)

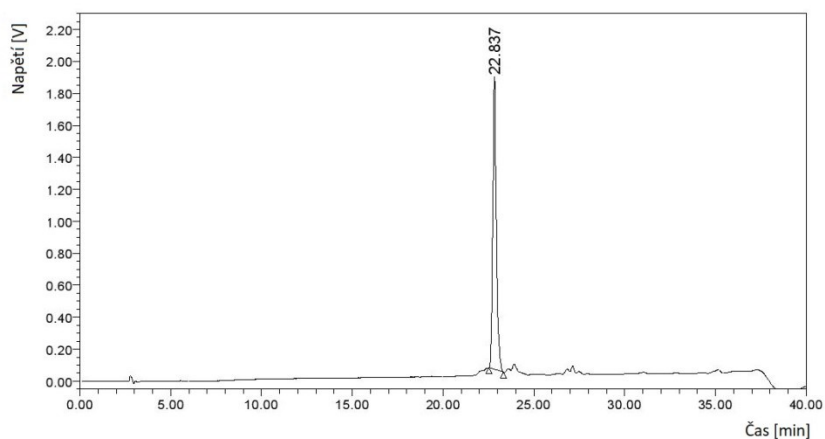
#### 4.1.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC)

Připravené peptidy byly purifikovány pomocí RP-HPLC na koloně Nucleosil 120-5 C18, 250 × 21 mm společnosti Macherey-Nagel za podmínek popsaných v kapitole 3.5.2. Čistota získaných peptidů byla ověřena na analytickém provedení RP-HPLC. Na následujících obrázcích jsou znázorněny chromatografické záznamy z analytického provedení RP-HPLC po purifikaci za účelem ověření čistoty.

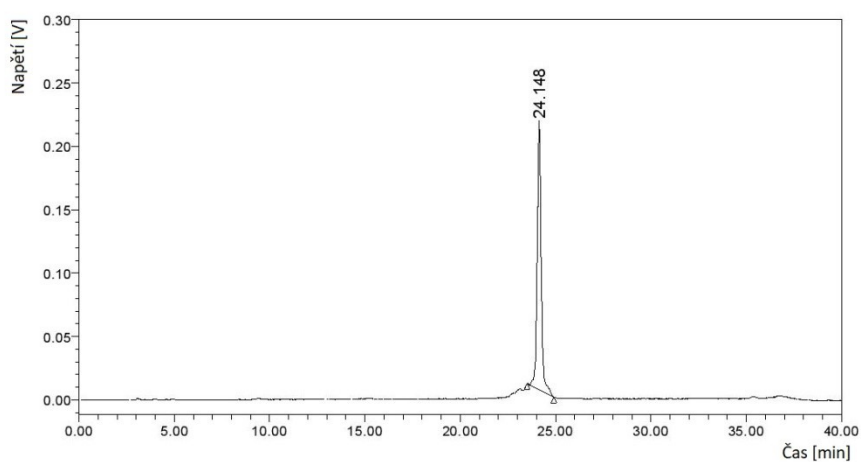


**Obr. 12:** Chromatogram z analytické RP-HPLC s píkem odpovídajícím lidskému preptinu

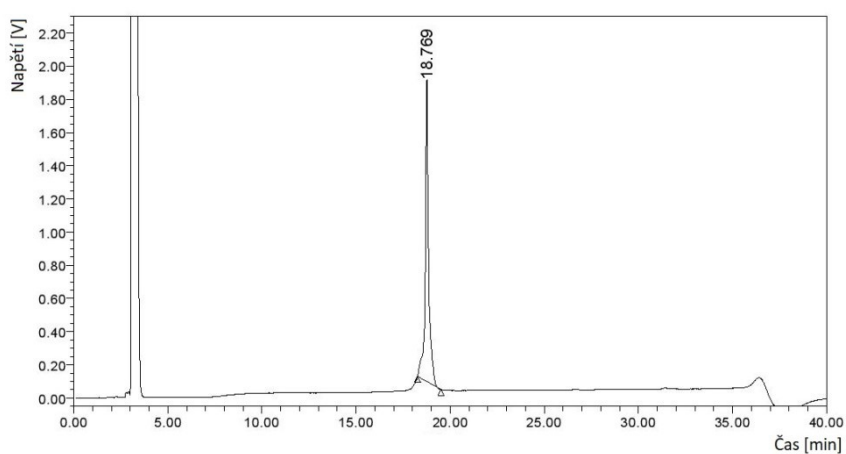




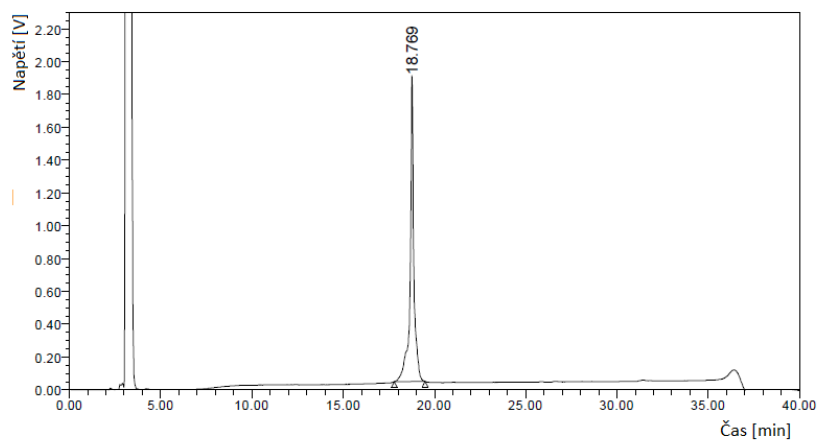
**Obr. 13:** Chromatogram z analytické RP-HPLC s píkem odpovídajícím fragmentu 1 lidského preptinu.



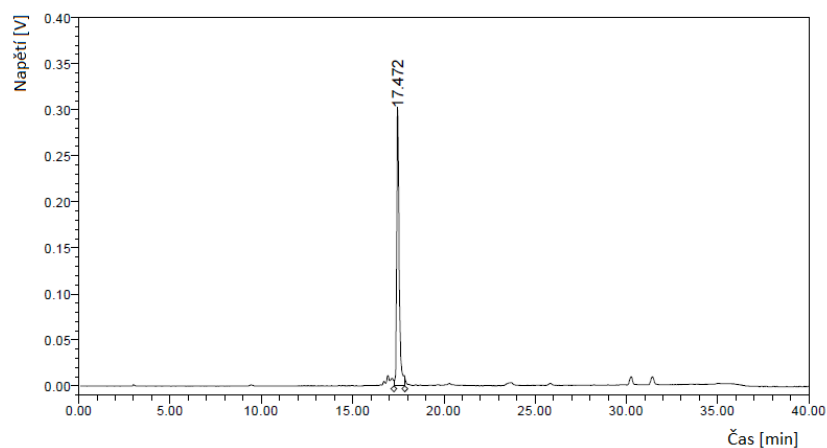
**Obr. 14:** Chromatogram z analytické RP-HPLC s píkem odpovídajícím fragmentu 2 lidského preptinu.



**Obr. 15:** Chromatogram z analytické RP-HPLC s píkem odpovídajícím potkanímu preptinu



**Obr. 16:** Chromatogram z analytické RP-HPLC s píkem odpovídajícím fragmentu 1 potkaního preptinu



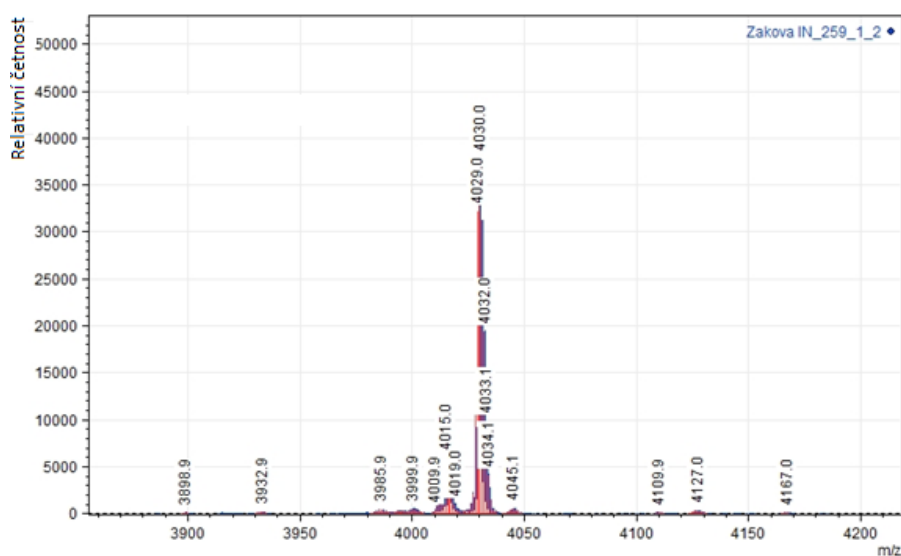
**Obr. 17:** Chromatogram z analytické RP-HPLC s píkem odpovídajícím fragmentu 2 potkaního preptinu

### 4.1.3 Hmotnostní spektrometrie

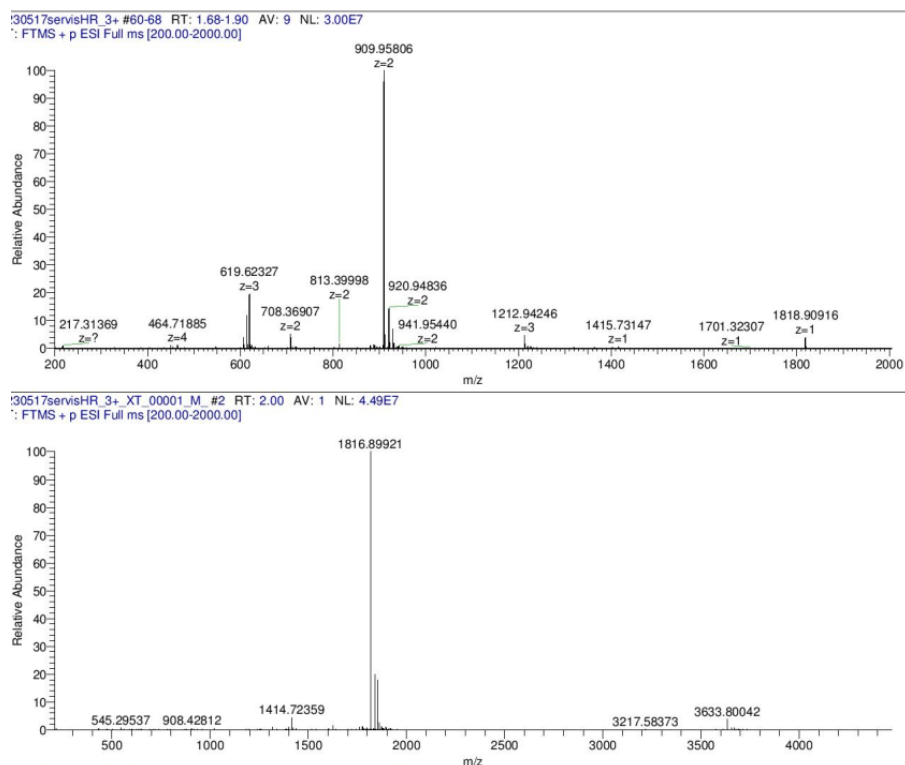
Předpokládaná teoretická molekulová hmotnost všech peptidů byla ověřena pomocí hmotnostní spektrometrie metodou ESI nebo MALDI v pozitivním módu. Teoretické a experimentální molekulové hmotnosti jsou uvedeny v Tab. 5.

**Tab. 5:** Srovnání teoretických a experimentálních molekulových hmotností jednotlivých peptidů.  $[M_r]_{\text{teor.}}$  označuje teoretickou molekulovou hmotnost,  $[M_r]_{\text{exp.}}$  značí experimentální molekulovou hmotnost zjištěnou pomocí hmotnostní spektrometrie.

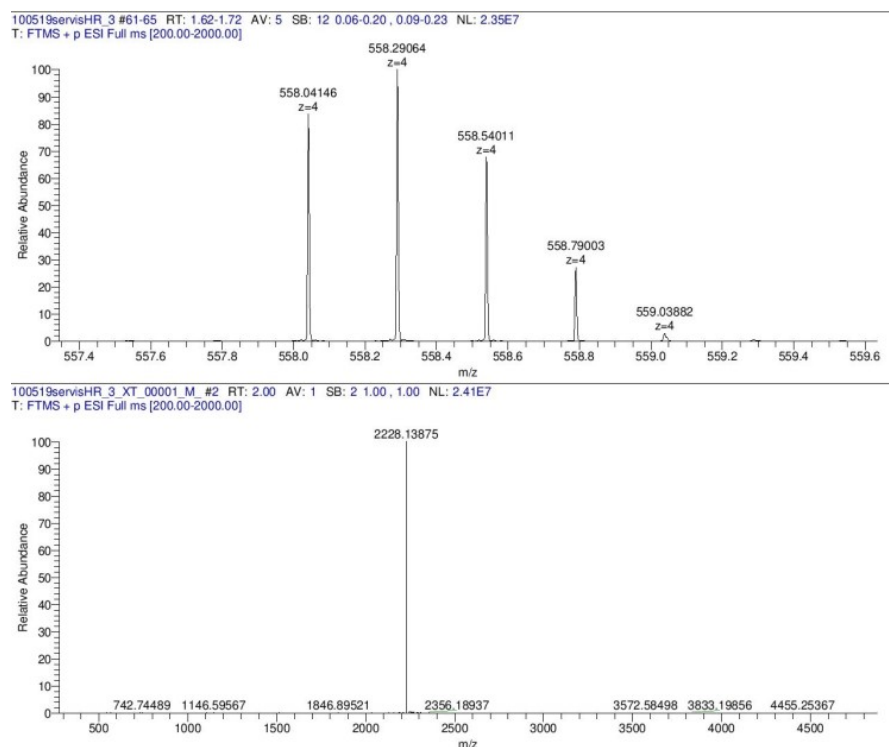
<i>Peptid</i>	$[M_r]_{\text{teor.}}$	$[M_r]_{\text{exp.}}$
Lidský preptin	4027,03	4027,035
Fragment 1 lidského preptinu	1816,90	1816,899
Fragment 2 lidského preptinu	2228,14	2228,139
Potkaní preptin	3929,99	3929,998
Fragment 1 potkaního preptinu	1808,86	1809,9
Fragment 2 potkaního preptinu	2139,14	2139,140



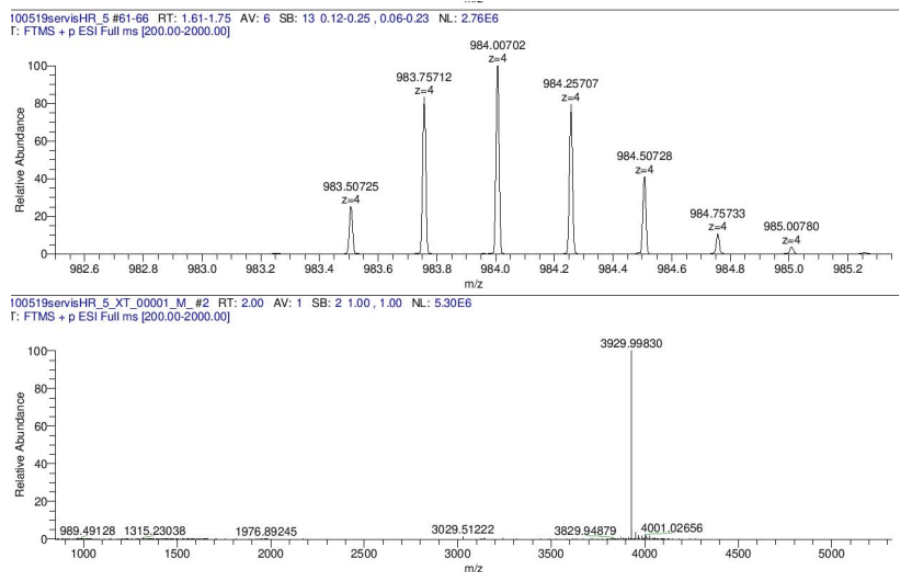
**Obr. 18:** Hmotnostní spektrum lidského preptinu. Naměřená molekulová hmotnost je 4027,035.



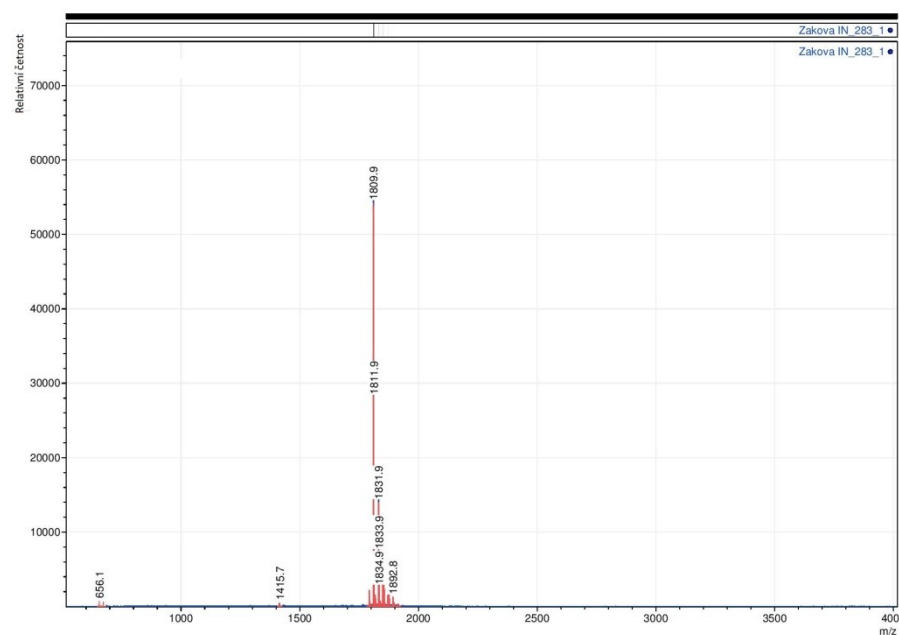
**Obr. 19:** Hmotnostní spektrum fragmentu 1 lidského preptinu. Naměřená molekulová hmotnost je 1816,899.



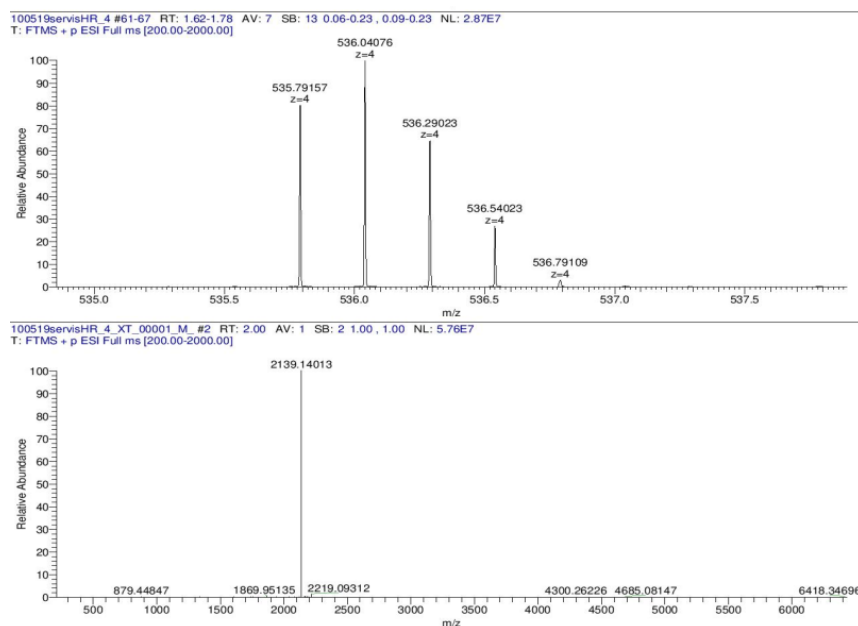
**Obr. 20:** Hmotnostní spektrum fragmentu 2 lidského preptinu. Naměřená molekulová hmotnost je 2228,139.



**Obr. 21:** Hmotnostní spektrum potkaního preptinu. Naměřená molekulová hmotnost je 3929,998.



**Obr. 22:** Hmotnostní spektrum fragmentu 1 potkaního preptinu. Naměřená molekulová hmotnost je 1809,9.

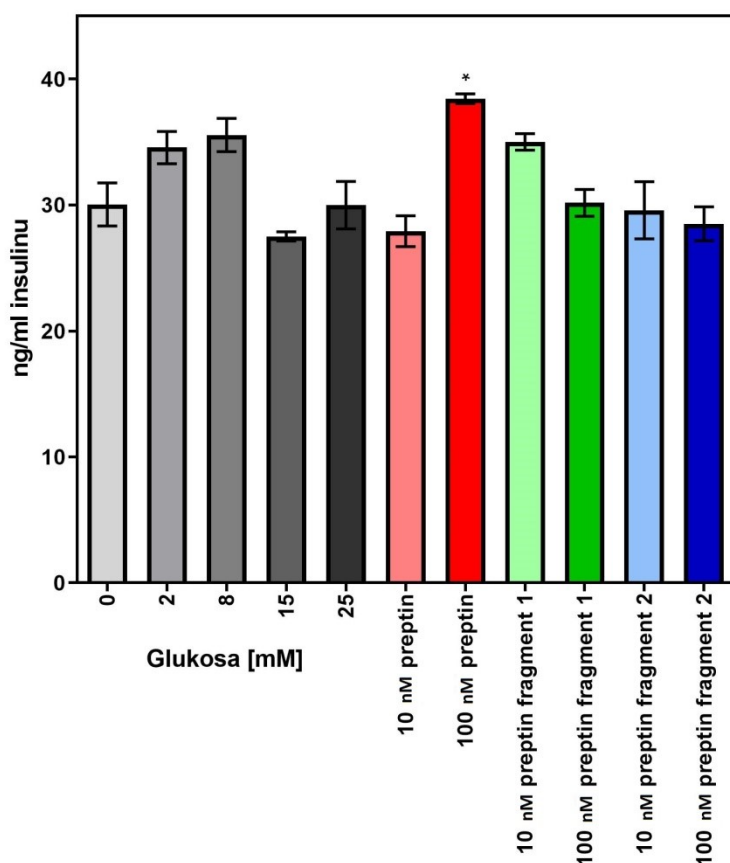


**Obr. 23:** Hmotnostní spektrum fragmentu 2 potkaního preptinu. Naměřená molekulová hmotnost je 2139,140.

## 4.2 Testování sekrece insulinu

### 4.2.1 Radioimunologické stanovení

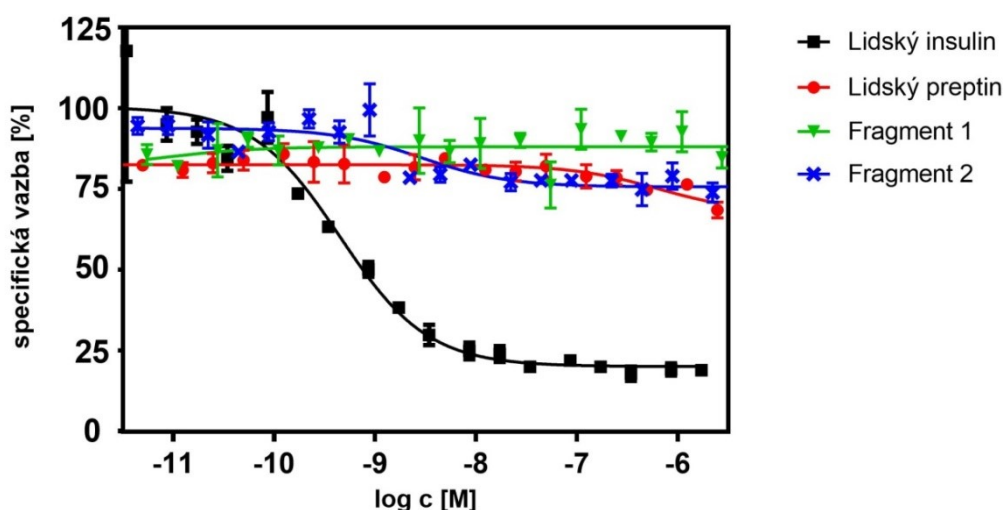
Testování sekrece insulinu probíhalo v potkaních pankreatických beta buňkách INS-1E metodou popsanou v kapitole 3.7. Testování bylo provedeno v duplikátech a množství insulinu vyprodukovaného buňkami na základě stimulace glukosou a 10nM respektive 100nM potkaním preptinem bylo stanoveno metodou RIA. Vyhodnocení naměřeného  $\gamma$  záření bylo provedeno v programu GraphPad Prism 5.0. Ze získaných hodnot byl sestaven graf znázorněný na Obr. 24. Testování bylo provedeno pouze pro potkaní preptin, jelikož jsme používali potkaní buňky. Z grafu lze vidět, že stimulace sekrece 100nM preptinem s 2mM glukosou se signifikantně liší od stimulace pouze 2mM glukosou.



**Obr. 24:** Znázornění výsledků testování vlivu preptinu na sekreci insulinu v přítomnosti glukosy. Pro porovnání byla měřena koncentrace insulinu po stimulaci různými koncentracemi glukosy (šedé sloupce). Barevné sloupce znázorňují vliv 10nM respektive 100nM preptinu a jeho dvou fragmentů na sekreci insulinu v přítomnosti 2mM glukosy. Hvězdička znamená, že výsledek se signifikantně liší od stimulace sekrece pouze 2mM glukosou. (\*,  $p < 0.05$ ).

### 4.3 Testování vazebné afinity preptinu k IR-A

Vazebné testy lidského preptinu k IR-A byly prováděny v linii lidských myeloidních lymfocytů IM-9 exprimujících výhradně tento receptor metodou popsanou v kapitole 3.8. Výsledky byly vyhodnoceny v programu GraphPad Prism 5.0 a ze získaných dat byla vytvořena vazebná křivka (viz Obr. 25). Z výsledků se dá usuzovat, že zatímco fragment 1 lidského preptinu není vůbec schopen kompetovat s  $^{125}\text{I}$ -lidským insulinem o vazebné místo na IR-A, fragment 2 a celý lidský preptin jsou schopny vytěsnit lidský insulin přibližně do 80 % a mohly by být považovány za velmi slabé agonisty lidského receptoru isoformy A.

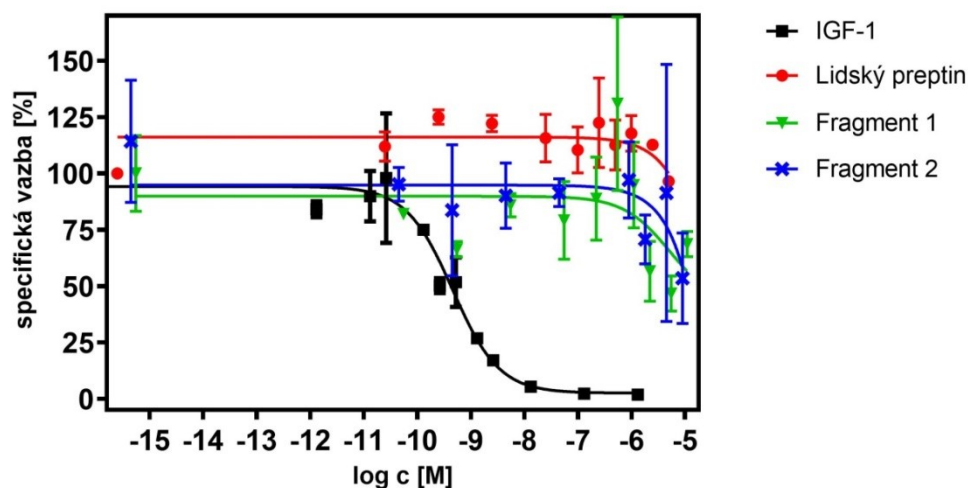


**Obr. 25:** Záznam výsledků vazebných testů lidského preptinu a jeho dvou fragmentů na insulinový receptor IR-A. Pro porovnání je uvedena kalibrační křivka představující vazbu lidského insulinu na IR-A v závislosti na koncentraci insulinu.

### 4.4 Testování vazebné afinity preptinu k IGF-1R

Testování vazebné afinity preptinu k IGF-1R bylo provedeno na linii myších fibroblastů  $R^+$  s deletovaným genem pro IGF-1R a transfekovaným genem pro lidský IGF-1R metodou popsanou v kapitole 3.9. Výsledky byly vyhodnoceny v programu GraphPad Prism 5.0 a ze získaných dat byla vytvořena vazebná křivka (viz Obr. 26). Z grafu je patrné, že ani jeden peptid není schopen vytěsnit radioaktivně značený  $^{125}\text{I}$ -IGF-1 z vazebného místa na IGF-1R, a tudíž preptin ani jeho fragmenty nejsou schopny se na tento receptor vázat.

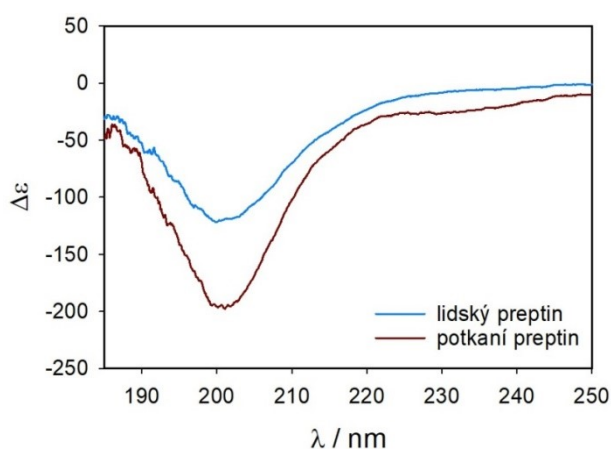




**Obr. 26:** Znázornění výsledků vazebných testů lidského preptinu a jeho dvou fragmentů na IGF-1 receptor. Pro porovnání je uvedena kalibrační křivka představující vazbu IGF-1 na tento receptor v závislosti na jeho koncentraci.

#### 4.5 Cirkulární dichroismus

Měření cirkulárního dichroismu probíhalo za podmínek popsanych v kapitole 3. 10. Výsledná spektra pro lidský i potkaní preptin jsou znázorněna na Obr. 27. Vidíme, že oba preptiny mají negativní minima okolo vlnové délky 200 nm, což nejvíce odpovídá spektru neuspořádané struktury (*angl.* random coil), přičemž negativní minimum potkaního preptinu je výraznější a dosahuje maxima až  $\Delta\epsilon = 200$  ( $\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). U potkaního preptinu se navíc vyskytuje pozitivní maximum při vlnové délce 220 nm, které by mohlo být způsobeno přítomností tzv. polyprolin II struktury.



**Obr. 27:** Znázornění CD spektra lidského a potkaního preptinu naměřeného při skenovací rychlosti 5 nm/min v rozsahu vlnových délek 190 až 250 nm.

## 5 Diskuse

Cílem této bakalářské práce byla příprava lidského a potkaního preptinu a jejich dvou fragmentů a následné testování vlivu potkaního preptinu a jeho dvou fragmentů na úroveň sekrece insulinu v beta buňkách v porovnání se sekrecí stimulovanou pouze glukosou bez přítomnosti preptinu. Součástí práce bylo také testování vazebné afinity preptinu k IR-A a IGF-1R.

V průběhu této práce se podařilo připravit lidský a potkaní preptin a jejich dva fragmenty automatickou syntézou na pevné fázi. Všechny připravené peptidy byly purifikovány pomocí RP-HPLC. Jejich molekulová hmotnost byla změřena na hmotnostním spektrometru.

Potkaní preptin byl následně použit k testování vlivu na sekreci insulinu při stimulaci potkaních beta buněk INS-1E 2mM glukosou a různými koncentracemi celého preptinu nebo jeho fragmentů. Pro porovnání výsledků bylo zároveň provedeno měření pouze v přítomnosti různých koncentrací glukosy (2mM až 25mM) bez preptinu. Vyhodnocení bylo provedeno metodou RIA. Z výsledků znázorněných na Obr. 24 na str. 38 je patrné, že množství insulinu vyloučeného beta buňkami nejprve roste spolu s rostoucí koncentrací glukosy a to až do koncentrace glukosy 8mM. Následně už množství vyprodukovaného insulinu klesá v důsledku usmrcení buněk glukosou, která zvyšuje osmotický tlak uvnitř buněk. U potkaního preptinu o koncentraci 10nM nedošlo k žádnému efektu, ale při zvýšení koncentrace preptinu na 100nM se sekrece insulinu signifikantně zvýšila oproti sekreci vyvolané pouze 2mM glukosou. Velmi mírně zesilující efekt vykazuje i fragment 1 při koncentraci 10nM. Při vyšší koncentraci fragmentu 1 už žádný vliv na změnu sekrece nebyl pozorován. Fragment 2 na základě našich výsledků nemá žádný vliv na metabolismus glukosy.

Testování vazebné afinity preptinu k IR-A v IM-9 buňkách a IGF-1R v R<sup>+</sup> buňkách bylo provedeno na základě kompetice mezi preptinem a radioaktivně značeným lidským insulinem, případně radioaktivně značeným lidským IGF-1 o vazbu na receptoru. Cílem těchto experimentů bylo ověřit, že preptin s těmito receptory nijak neinteraguje. Jak je uvedeno v teoretické části této práce, není dosud znám přesný mechanismus působení preptinu. Jeden z předpokladů je, že se váže na IGF-2R, přes který následně působí. Z časových důvodů není do této práce zařazeno testování vazebné afinity preptinu na IGF-2R. Z výsledků je patrné, že preptin ani jeho fragmenty se neváží na IGF-1R. Avšak podle výsledků vazebných testů na IR-A jsou fragment 2 a celý lidský preptin schopny vytěsnit

radioaktivně značený insulin z receptoru na přibližně 80 %. Mohly by tedy být považovány za parciální agonisty. Tento fakt je překvapující, a proto se v dalších experimentech budeme zabývat schopností těchto dvou peptidů vyvolat nějaký efekt po vazbě na IR-A. Cílem bude zjistit, jestli jsou tyto peptidy schopny aktivace tyrosinkinasové domény insulinového receptoru a následného spuštění signalizačních drah.

Vzhledem k omezenému množství informací o mechanismu působení preptinu by jakékoliv informace o jeho prostorové struktuře mohla být užitečná. Proto jsme se v této práci pokusili určit sekundární strukturu lidského i potkaního preptinu pomocí měření cirkulárního dichroismu. Výsledek měření znázorněný na Obr. 27 na str. 40 odpovídá předpokladu, že lidský i potkaní preptin mají podobnou strukturu. Z tohoto obrázku vidíme, že oba preptiny mají negativní minima okolo vlnové délky 200 nm, což nejvíce odpovídá spektru neuspořádané struktury (*angl.* random coil). U potkaního preptinu se navíc vyskytuje pozitivní maximum při vlnové délce 220 nm, které by mohlo být způsobeno přítomností tzv. polyprolin II struktury. Neuspořádaná struktura i polyprolin II struktura se vyskytují v peptidech obsahujících větší množství prolinů, které narušují jiné sekundární struktury, např. alfa helix. Potkaní preptin obsahuje ve svém řetězci 3 prolíny a lidský preptin dokonce 5 prolinů, což odpovídá 9% respektive 15% zastoupení prolinů v primární struktuře. K polyprolin struktuře navíc napomáhají i jiné aminokyseliny jako např. kyselina asparagová a lysin, které jsou v primární sekvenci preptinu hojně zastoupeny. Z výsledků CD spektroskopie se tedy dá usuzovat, že sekundární struktura obou peptidů je směs polyprolinu II a neuspořádané struktury, přičemž lidský preptin má patrně větší zastoupení neuspořádané struktury než preptin potkaní kvůli absenci pozitivního maxima při 220 nm. Navíc potkaní preptin má nejspíš výraznější sekundární strukturu než lidský preptin, protože má intenzivnější spektrum, které dosahuje maxima až  $\Delta\epsilon = 200 \text{ (mol}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{)}$ .

V dalších krocích bude testována vazebná afinita preptinu a jeho fragmentů na IGF-2R, což by společně s informacemi o struktuře mohlo pomoci k pochopení mechanismu jeho působení na sekreci insulinu i stimulaci růstu osteoblastů. Dále, jak již bylo řečeno, se bude také testovat schopnost preptinu a jeho fragmentu 2 aktivovat tyrosinkinasovou doménu IR-A a spustit následnou signalizační kaskádu. Pochopení působení preptinu by mohlo být klíčové pro jeho další studium a v budoucnu i pro jeho potenciální význam jako možného terapeutika v léčbě diabetu mellitu, insulinové rezistence, některých druhů rakoviny nebo osteoporózy.

## 6 Závěr

V průběhu vypracování této bakalářské práce se podařilo připravit lidský i potkaní preptin a jejich dva fragmenty 1-16 a 17-34 AMK. U potkaního preptinu o koncentraci 100nM v přítomnosti 2mM glukosy byla zjištěna signifikantní schopnost zesilovat sekreci insulinu v beta buňkách. Pomocí vazebných testů se podařilo ověřit, že se preptin ani jeho fragmenty neváží na IGF-1R. Z výsledků vazebných testů na IR-A bylo zjištěno, že celý preptin a jeho fragment 2 by patrně mohly být považovány za parciální agonisty tohoto receptoru.

## 7 Seznam použité literatury

- [1] R. Čihák, M. Grim: Pankreas, v knize *Anatomie 2*, Grada Publishing, Praha, str. 135–136 (2002)
- [2] C. M. Buchanan, A. R. J. Phillips, G. J. S. Cooper: *Biochem. J.* 360 (2), 431–439 (2001)
- [3] M. J. Adams *et al.*: *Nature* 224 (5218), 491–495 (1969)
- [4] L. Žáková, J. Jiráček: *Chem. List.* 99 (11), 772–781 (2005)
- [5] C. J. Hedekov: *Physiol. Rev.* 60 (2), 442–509 (1980)
- [6] T. J. Merimee, J. Zapf, E. R. Froesch: *N. Engl. J. Med.* 309 (9), 527–530 (1983)
- [7] J. Cornish J., K. E. Callon, G. J. S. Cooper, I. R. Reid: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 207 (1), 133–139 (1995)
- [8] H. M. Goodman: *Basic Medical Endocrinology*. Academic Press, Elsevier, Cambridge (2009)
- [9] L. Whiting: Peptide hormones as regulators of glucose homeostasis: Kandidátská disertační práce School of Biological Science, Auckland University (2014)
- [10] J. Cornish *et al.*: *Am. J. Physiol. Metab.* 292 (1), E117–E122 (2007)
- [11] J. Cornish, K. E. Callon, I. R. Reid: *Calcif. Tissue Int.* 59 (6), 492–495 (1996)
- [12] G. J. S. Cooper, A. C. Willis, A. Clarkt, R. C. Turnert, R. B. Sim, K. B. M. Reid: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 (23), 8628–8632 (1987)
- [13] Z. Amso *et al.*: *Org. Biomol. Chem.* 14 (39), 9225–9238 (2016)
- [14] Z. Amso: Synthetic Peptides as Potential Therapies for Osteoporosis and Bacterial Infections: Design, Synthesis, and Biological Evaluation: Kandidátská disertační práce School of Chemical Sciences, Auckland University (2017)
- [15] Y. Baykus *et al.*: *Clin. Biochem.* 45 (3), 198–202 (2012)

- [16] Z. Bu, K. Kuok, J. Meng, R. Wang, B. Xu, H. Zhang: *Reprod. Biol. Endocrinol.* 10 (10), (2012)
- [17] R. E. Humbel: *Eur. J. Biochem.* 190 (3), 445–462 (1990)
- [18] G. Fürstenberger, H. J. Senn: *Lancet Oncol.* 3 (5), 298–302 (2002)
- [19] A. G. Renehan, J. Jones, S. T. O'Dwyer, S. M. Shalet: *Growth Horm. IGF Res.* 13 (6), 341–346 (2003)
- [20] C. Livingstone: *Endocr. Relat. Cancer* 20 (6), 321–339 (2013)
- [21] C. Williams *et al.*: *Structure* 15 (9), 1065–1078 (2007)
- [22] P. De Meyts: *BioEssays* 37 (4), 389–397 (2015)
- [23] A. M. Torres, B. E. Forbes, S. E. Aplin, J. C. Wallace, G. L. Francis, R. S. Norton: *J. Mol. Biol.* 248 (2), 385–401 (1995)
- [24] N. J. Haywood, T. A. Slater, C. J. Matthews, S. B. Wheatcroft: *Mol. Metab.* 19, 86–96 (2018)
- [25] S. D. O. Dell, I. N. M. Day: *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 30 (7), 767–771 (1998)
- [26] Y. Dynkevich *et al.*: *Endocr. Rev.* 34 (6), 798–826 (2013)
- [27] A. Basak, Q. Qiu, B. K. Tsang, A. Gruslin, M. Mbikay: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (31), 11047–11052 (2005)
- [28] H. M. El-Shewy, M. H. Lee, L. M. Obeid, A. A. Jaffa, L. M. Luttrell: *J. Biol. Chem.* 282 (36), 26150–26157 (2007)
- [29] A. Belfiore, F. Frasca, G. Pandini, L. Sciacca, R. Vigneri: *Endocr. Rev.* 30 (6), 586–623 (2009)
- [30] A. M. Fair *et al.*: *Cancer Detect. Prev.* 31 (3), 214–219 (2007)
- [31] J. Jiráček, L. Žáková: *Front. Endocrinol.* 8 (167), (2017)
- [32] A. Ullrich *et al.*: *EMBO J.* 5 (10), 2503–2512 (1986)

- [33] A. Denley, J. C. Wallace, L. J. Cosgrove, B. E. Forbes: *Horm. Metab. Res.* 35 (11-12), 778–785 (2003)
- [34] M. L. Bayne *et al.*: *J. Biol. Chem.* 264 (19), 11004–11008 (1989)
- [35] D. Modan-Moses, M. Janicot, J. C. McLenithan, M. D. Lane, S. J. Casella: *Biochem. J.* 333 (3), 825–831 (1998)
- [36] T. Braulke: *Horm. Metab. Res.* 31 (2-3), 242–246 (2008)
- [37] E. C. Dell’Angelica, G. S. Payne: *Cell.* 106 (4), 395–398 (2001)
- [38] N. M. Dahms, P. Lobel, S. Kornfeld: *J. Biol. Chem.* 264 (21), 12115–12118 (1989)
- [39] S. T. Reddy, W. Chai, R. A. Childs, J. D. Page, T. Feizi, N. M. Dahms: *J. Biol. Chem.* 279 (37), 38658–38667 (2004)
- [40] J. Brown, R. M. Esnouf, M. A. Jones: *EMBO J.* 21 (5), 1054–1062 (2002)
- [41] J. Linnell, G. Groeger, A. B. Hassan: *J. Biol. Chem.* 276 (26), 23986–23991 (2001)
- [42] M. Cruz-Correa *et al.*: *Gastroenterology* 126 (4), 964–970 (2004)
- [43] J. Brown *et al.*: *EMBO J.* 27 (1), 265–276 (2008)
- [44] K. C. Cheng *et al.*: *J. Endocrinol.* 215 (1), 43–49 (2012)
- [45] T. I. Croll *et al.*: *Structure* 24 (3), 469–476 (2016)
- [46] P. De Meyts, J. Whittaker: *Nat. Rev. Drug Discov.* 1 (10), 769–783 (2002)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka